

Verbesserung einer Adenovirus-basierten anti-retroviralen Vakzine durch Verwendung genetischer Adjuvanzien

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
der Fakultät für
Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Inga Ohs
aus Duisburg

Dezember 2013

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Virologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulf Dittmer
2. Gutachter: Prof.'in Dr. Astrid Westendorf

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Ralf Küppers

Tag der mündlichen Prüfung: 02.04.2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis.....	XI
1 Einleitung	1
1.1 Retroviren.....	1
1.1.1 Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)	1
1.1.2 Friend Virus (FV).....	4
1.2 Orthomyxoviren.....	6
1.2.1 Influenzaviren.....	6
1.3 Adenovirale Vektoren	7
1.4 Das Immunsystem	10
1.4.1 Angeborene Immunität.....	10
1.4.2 Adaptive Immunität	11
1.4.2.1 CD4 ⁺ T-Zellen.....	11
1.4.2.2 CD8 ⁺ T-Zellen.....	13
1.4.2.3 B-Lymphozyten	14
1.4.3 Cytokine	15
1.4.3.1 Interleukine.....	15
1.4.3.2 Chemokine	16
1.5 Immunisierungsstrategien	17
1.5.1 Impfstoffentwicklung gegen retrovirale Infektionen.....	20
2 Zielsetzung.....	22
3 Material.....	23
3.1 Geräte.....	23
3.2 Verbrauchsmaterialien.....	24
3.3 Reagenzsysteme.....	25
3.4 Standards	26
3.5 Chemikalien	26
3.6 Puffer und Lösungen	28
3.7 Medien.....	30
3.8 Enzyme.....	31
3.9 Plasmide	31

3.10 Oligonukleotide.....	32
3.11 Peptide.....	32
3.12 Antikörper und Tetramere.....	33
3.13 Fluoreszenzmarkierte Antikörper	33
3.14 Antibiotika	33
3.15 Zelllinien	34
3.16 Bakterien	34
3.17 Viren	34
3.18 Versuchstiere.....	35
4 Methoden.....	36
4.1 Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	36
4.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
4.1.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA	36
4.1.3 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	36
4.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten.....	37
4.1.5 TA-Klonierung	37
4.1.5.1 Anhängen eines Adenosin-Überhangs	37
4.1.5.2 TA-Klonierung.....	37
4.1.6 Transformation von Bakterien	37
4.1.6.1 Transformation chemisch kompetenter Bakterien	37
4.1.6.2 Herstellung elektrokompenter Bakterien	37
4.1.6.3 Transformation elektrokompenter Bakterien.....	37
4.1.7 Plasmidisolation in analytischem Maßstab (Mini-Prep)	38
4.1.8 Plasmidisolation in präparativem Maßstab (Maxi-Prep).....	38
4.1.9 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	38
4.1.10 Fällung von geschnittener Plasmid-DNA	38
4.1.11 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	38
4.1.12 Sequenzierung	38
4.2 Proteinbiochemische Methoden.....	38
4.2.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	38
4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
4.2.3 Western Blot.....	39
4.3 Zytologische Methoden	39
4.3.1 Kultivierung von Zellen	39
4.3.2 Zellen einfrieren und auftauen	40
4.3.3 DNA-Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Methode	40
4.3.4 DNA-Transfektion mittels Polyethylenimin (PEI).....	40

4.3.5 DNA-Transfektion mittels Lipofektamin	40
4.3.6 Virusanzucht	40
4.3.7 Aufreinigung von adenoviralen Vektoren.....	41
4.3.8 Titerbestimmung.....	41
4.3.8.1 TCID ₅₀	41
4.3.8.2 Titerbestimmung mittels optischer Dichte	41
4.4 Immunologische Methoden	41
4.4.1 Vakzinierung	41
4.4.2 Infektion.....	42
4.4.3 Kontrolle des Infektionsverlaufs	42
4.4.3.1 Palpation der Milz während der FV-Infektion	42
4.4.3.2 Gewichtsverlauf während der Influenzainfektion	42
4.4.4 Blutentnahme	42
4.4.5 Bestimmung der Viruslast.....	43
4.4.5.1 Bestimmung der Plasma-Virämie während der FV-Infektion.....	43
4.4.5.2 Immunocytochemische Bestimmung der Viruslast in der Milz im <i>infectious</i> <i>center</i> -(IC-) Assay bei FV-Infektion.....	43
4.4.5.3 Bestimmung der Viruslast in der Milz mittels RT-qPCR bei FV-Infektion	43
4.4.5.4 Bestimmung der Viruslast in BAL und Lunge bei Influenzainfektion durch RT- qPCR.....	44
4.4.6 Bestimmung der humoralen Immunantwort	45
4.4.6.1 Bindende Antikörper mittels ELISA.....	45
4.4.6.2 Neutralisierende Antikörper gegen FV	45
4.4.6.3 Neutralisierende Antikörper gegen das Influenzavirus	46
4.4.6.4 neutralisierende IgG-Antikörper	46
4.4.7 Bestimmung der zellulären Immunantwort	47
4.4.7.1 Probenvorbereitung	47
4.4.7.2 Oberflächenfärbung.....	47
4.4.7.3 Intrazelluläre Färbung.....	47
4.4.7.4 Tetramerfärbung.....	47
4.4.7.5 Peptidstimulation	48
4.4.7.6 Verwendete Antikörper	48
4.5 Statistische Analysen.....	49
5 Ergebnisse.....	50
5.1 Herstellung Adenovirus-basierter Impfvektoren.....	50
5.2 Prophylaktische Immunisierungen	54
5.2.1 Interleukin-kodierende Vektoren als genetisches Adjuvans im FV-Modell	54

5.2.1.1 Schutz vor FV-Infektion nach Koimmunisierung mit Interleukinvektoren.....	55
5.2.1.2 Analyse von Immunantworten nach Koimmunisierung mit Interleukinvektoren.....	57
5.2.2 Interleukinvektoren als genetisches Adjuvans im Influenzavirus-Modell.....	61
5.2.2.1 Schutz vor Influenzavirus-Infektion	61
5.2.2.2 Analyse von Immunantworten nach Koimmunisierung mit Interleukinvektoren.....	63
5.2.3 Chemokin-kodierende Impfvektoren als genetisches Adjuvans im FV-Modell	65
5.2.3.1 Schutz vor FV-Infektion.....	65
5.2.3.2 Analyse von Antikörperantworten nach Koimmunisierung mit Chemokinvektoren.....	66
5.2.4 Thioredoxin-gp70-Fusionsproteine als genetisches Adjuvans im FV-Modell	67
5.2.4.1 Immunisierung mit dem Vektor Ad.secTxngp70 ^{pIXgp70}	70
5.2.5 Kombination aus Interleukin-adjuvantiertem Ad.pIXgp70 und CTL-induzierendem Vektor	74
5.2.5.1 Schutz vor FV-Infektion.....	75
5.2.5.2 Analyse von Immunantworten auf die verabreichte Vakzine	76
5.3 Therapeutische Immunisierungen im FV-Modell	80
5.3.1 Kombination aus Ad5.pIXgp70 und Interleukin-kodierenden Vektoren.....	80
5.3.2 Verwendung der CTL-induzierenden Vakzine Ad5.TxnGagL	83
5.3.2.1 Präimmunisierung mit Ad5.IL4	83
5.3.2.2 Präimmunisierung mit Ad5.IFN γ	86
5.3.2.3 Präimmunisierung mit Ad5.IL23.....	88
6 Diskussion.....	91
6.1 Prophylaktische Vakzinierung	91
6.2 Therapeutische Vakzinierung.....	98
7 Zusammenfassung	100
Literaturverzeichnis	101
Danksagung.....	110
Lebenslauf	111
Erklärungen	112

Abkürzungsverzeichnis

Ad	Adenovirus	HA	Hämagglutinin
AF700	Alexa Fluor 700	HAART	<i>Highly active antiretroviral therapy</i>
AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>	HBsAg	Oberflächenantigen des Hepatitis B-Virus
AK	Antikörper	HEF	Hämagglutinin-Esterase-Fusionsprotein
Alum	Aluminiumhydroxid	HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
APC	Antigenpräsentierende Zelle	HIV	Humanes Immundefizienzvirus
APC	Allophycocyanin	HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cyanin7	HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
BAL	Bronchoalveoläre Lavage	IC	<i>Infectious center</i>
BCL-6	<i>B cell lymphoma 6</i>	ICS	Intracellular cytokine staining
BCR	B-Zellrezeptor	IFN	Interferon
bp	Basenpaare	Ig	Immunglobulin
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor	IL	Interleukin
cDNA	complementary DNA	JAK	Januskinase
CMV	Cytomegalievirus	kb	Kilobasenpaare
CTL	<i>Cytotoxic T-lymphocyte</i>	kDa	Kilodalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure	M	molar
eF450	eFluor 450	MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
eF605	eFluor 605	NA	Neuraminidase
eF710	eFluor 710	NK	Natürliche Killerzellen
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	NNRTI	Nicht-nukleosidische RT-Inhibitoren
Env	<i>Envelope glycoprotein</i>	NRTI	Nukleotid- und Nukleosidanalogue RT-Inhibitoren
Eomes	<i>Eomesodermin</i>	OD	Optische Dichte
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
FFU	<i>Focus-forming units</i>	PAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
F-MuLV	Murines Friend Leukämievirus	PE	Phycoerythrin
Foxp3	<i>Forkhead box protein 3</i>	Pe-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin7
FV	Friend Virus		
Gag	<i>Group-specific antigen</i>		
GagL	<i>leader</i> Epitop des Friend Virus		
GATA-3	<i>GATA-binding protein 3</i>		

PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex	SIV	Simianes Immundefizienzvirus
PFU	<i>Plaque-forming units</i>	STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
Pol	<i>Polymerase</i>	T-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>
RNA	Ribonukleinsäure	TCID ₅₀	Tissue Culture Infection Dose 50
RT	Raumtemperatur	Tet	Tetramer
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transkriptase-PCR	T _{FH}	Follikuläre T-Helferzellen
SFFU	<i>Spleen focus-forming units</i>	TGF	<i>Transforming growth factor</i>
SFFV	<i>Spleen focus forming virus</i>	T _H	T-Helferzelle
sf-Stk	Zelluläre Serin/Threonin-Kinase	TNF	Tumornekrosefaktor
SHIV	Simian/humanes Immundefizienzvirus	T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
		Txn	Thioredoxin
		UV	Ultraviolett
		vp	Virale Partikel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genomaufbau und -struktur von HIV-1	2
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines HIV-1 Viruspartikels.....	2
Abbildung 3: HIV Replikationszyklus (verändert nach [147])	3
Abbildung 4: Genom von F-MuLV und SFFV.....	5
Abbildung 5: Splenomegalie durch FV-Infektion [58]	5
Abbildung 6: Schematischer Genomaufbau des humanen Adenovirus Typ 5.....	8
Abbildung 7: Struktur eines Adenoviruspartikels	8
Abbildung 8: Differenzierung der CD4 ⁺ Subpopulationen (verändert nach [133])	12
Abbildung 9: Sicherheit und Effizienz verschiedener Immunisierungsmöglichkeiten (verändert nach [65]).....	19
Abbildung 10: <i>Expression/display</i> -Vektor Ad.pIXgp70	21
Abbildung 11: AdEasy-System.....	50
Abbildung 12: Aufbau Interleukin-kodierender, adenoviraler Vektoren.....	51
Abbildung 13: Aufbau Chemokin-kodierender, adenoviraler Vektoren.....	52
Abbildung 14: Strategie für Ad.secTxngp70 ^{pIXgp70}	53
Abbildung 15: Adenovirale Vektoren mit Thioredoxin-gp70-Fusionsprotein.....	53
Abbildung 16: Zeitlicher Ablauf der Interleukinversuche	55
Abbildung 17: Milzgewichte nach Koimmunisierung mit Interleukinvektoren	56
Abbildung 18: Viruslasten in Plasma und Milz nach Koimmunisierung mit Interleukinvektoren	56
Abbildung 19: Virusspezifische CD4 ⁺ T-Zellantworten nach Koapplikation der Interleukinvektoren	57
Abbildung 20: Bindende Antikörperantworten nach der ersten und zweiten Immunisierung.....	58
Abbildung 21: Neutralisierende Antikörper nach der zweiten Immunisierung	59
Abbildung 22: Neutralisierende Antikörper nach Belastungsinfektion.....	60
Abbildung 23: Zeitlicher Ablauf der Influenzaversuche	61
Abbildung 24: Gewichtsverlauf der Versuchstiere nach Influenzainfektion	62
Abbildung 25: Viruslasten in BAL und Lunge nach Influenzainfektion.....	62
Abbildung 26: Bindende Antikörper nach der zweiten Immunisierung.....	63
Abbildung 27: Neutralisierende Antikörper nach der ersten und zweiten Immunisierung	64
Abbildung 28: Milzgewichte nach Koimmunisierung mit Chemokinvektoren	65
Abbildung 29: Viruslasten nach Koimmunisierung mit Chemokinvektoren	66
Abbildung 30: Humorale Immunantworten nach Koimmunisierung mit Chemokinvektoren	67
Abbildung 31: Milzgewichte nach Immunisierung mit Ad.secTxngp70.....	68
Abbildung 32: Viruslasten in Mäusen immunisiert mit Ad.secTxngp70.....	69

Abbildung 33: Humorale Immunantworten nach Immunisierung mit Ad.secTxngp70.....	69
Abbildung 34: Milzgewichte nach Immunisierung mit Ad.secTxngp70pIXgp70	71
Abbildung 35: Viruslasten in Plasma und Milz nach Immunisierung mit Ad.secTxngp70pIXgp70	71
Abbildung 36: Virusspezifische CD4 ⁺ T-Zellantworten in der Milz.....	72
Abbildung 37: Bindende Antikörper nach der zweiten Immunisierung.....	73
Abbildung 38: Gesamt neutralisierende und neutralisierende IgG-Antikörper nach Infektion	73
Abbildung 39: Zeitlicher Versuchsablauf zum Vergleich einer Adenovirus-basierten und lebend-attenuierten Vakzine im FV-Modell	75
Abbildung 40: Milzgewichte und Kontrolle des Infektionsverlaufs mittels Palpation der Milzgrößen.....	75
Abbildung 41: Viruslasten in Plasma und Milz	76
Abbildung 42: Tetramer I-Färbung nach der ersten Immunisierung	77
Abbildung 43: Analyse der intrazellulären Cytokine IFN γ und TNF α	77
Abbildung 44: Antikörperantworten nach der letzten Immunisierung.....	78
Abbildung 45: Neutralisierende und neutralisierende IgG-Antikörperantworten nach Belastungsinfektion	79
Abbildung 46: Versuchsablauf der therapeutischen Impfung mit Ad5.pIXgp70 und Ad5.env.....	81
Abbildung 47: Viruslasten nach Immunisierung mit Ad5.pIXgp70 und Ad5.env	81
Abbildung 48: CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zellantworten nach Impfung mit Ad5.pIXgp70 bzw. Ad5.env ...	82
Abbildung 49: Regulatorische T-Zellantworten nach Impfung mit Ad5.pIXgp70 bzw. Ad5.env ...	82
Abbildung 50: Zeitlicher Ablauf der therapeutischen Präimmunisierung mit Ad5.IL4	84
Abbildung 51: Viruslasten in mit Ad5.IL4 präimmunisierten Mäusen.....	84
Abbildung 52: Cytotoxische CD8 ⁺ T-Zellantworten nach Präimmunisierung mit Ad5.IL4	85
Abbildung 53: Analyse regulatorischer T-Zellen in Ad5.IL4-präimmunisierten Mäusen.....	85
Abbildung 54: Zeitlicher Versuchsablauf der Präimmunisierung mit Ad5.IFN γ	86
Abbildung 55: Viruslasten in Milz und Lymphknoten nach Präimmunisierung mit Ad5.IFN γ	86
Abbildung 56: CD8 ⁺ T-Zellantworten in Lymphknoten nach Präimmunisierung mit Ad5.IFN γ ...	87
Abbildung 57: Aktivität regulatorischer T-Zellen nach Präimmunisierung mit Ad5.IFN γ	88
Abbildung 58: Versuchsablauf der Präimmunisierung mit Ad5.IL23	88
Abbildung 59: Viruslasten in Milz und Lymphknoten nach Präimmunisierung mit Ad5.IL23	89
Abbildung 60: Cytokinproduktion nach Präimmunisierung mit Ad5.IL23.....	90
Abbildung 61: Regulatorische T-Zellantworten nach Präimmunisierung mit Ad5.IL23	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: FACS-Färbungen der FV-Experimente.....	48
Tabelle 2: FACS-Färbungen der Influenza-Experimente	48
Tabelle 3: Herstellung von Interleukin-kodierenden Vektoren	51
Tabelle 4: Herstellung Chemokin-kodierender, adenoviraler Vektoren	52
Tabelle 5: Adenovirale Vektoren, die Thioredoxin-gp70 Fusionsproteine kodieren	53

1 Einleitung

1.1 Retroviren

Reverse Transkriptase Onkoviren, kurz Retroviren, sind umhüllte RNA-Viren, die etwa 80 - 100 nm groß sind und über zwei Kopien linearer Positivstrang-RNA verfügen. In der Familie der *Retroviridae* werden die Unterfamilien Onkoviren (Gattungen α - ϵ), Lentiviren und Spumaviren unterschieden. Weiterhin können einfache und komplexe Retroviren unterschieden werden; die Genome einfacher Retroviren verfügen lediglich über die Strukturgene *gag*, *pol* und *env* wohingegen komplexe Retroviren zusätzlich verschiedene regulatorische und akzessorische Proteine kodieren. Exogene Retroviren, bei denen ein vollständiger Replikationszyklus inklusive der Freisetzung infektiöser Partikel erfolgt, werden zudem von endogenen Retroviren unterschieden, die aufgrund von Gendefekten und Deletionen keinen Infektionszyklus mehr durchlaufen, vertikal über die Keimbahn übertragen werden und somit ins Genom aller Zellen integriert sind.

Die Besonderheiten von Retroviren sind zum einen, dass für die Virusreplikation das virale RNA-Genom zunächst in DNA umgeschrieben werden muss, wozu das Virus über das Enzym Reverse Transkriptase verfügt. Zum anderen erfolgt eine Integration des Provirus in das Wirtszellgenom, wodurch die folgende Transkription durch zelluläre Polymerasen erfolgt. Somit ist eine vollständige Eliminierung des Virus aus einem Organismus sehr schwierig.

Retroviren treten insbesondere bei Wirbeltieren auf, in denen sie Immundefizienzen und Tumorerkrankungen auslösen. Das erste Retrovirus, das Rous-Sarkom-Virus [120], wurde Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckt, gefolgt von weiteren wie dem Simianen Foamy-Virus [34], dem Friend Virus [42] oder dem Feline Leukämie-Virus [67]. Das erste humanpathogene Retrovirus, das humane T-lymphotrope Virus (HTLV) [114] wurde erst zu Beginn der 1980er Jahre entdeckt. Der wohl bekannteste Vertreter der Retroviren, das Humane Immundefizienzvirus (HIV), wurde 1983 erstmals isoliert [4].

1.1.1 Humanes Immundefizienz-Virus (HIV)

Das humane Immundefizienz-Virus (HIV), das die Immunschwächekrankheit AIDS (*acquired immune deficiency syndrome*) auslöst, gehört zur Familie der *Retroviridae* und der Gattung der *Lentiviren*. Unterschieden werden dabei die beiden Spezies HIV-1 und HIV-2. Weltweit gibt es derzeit 35,3 Millionen Infizierte (Stand: Ende 2012, WHO), die Anzahl jährlicher Neuinfektionen lag im Jahr 2012 bei 2,3 Millionen, während 1,6 Millionen Infizierte starben [154]. Das HI-Virus ist weltweit verbreitet und kommt besonders häufig im Sub-Sahararaum Afrikas vor, hier liegt die Anzahl HIV-Positiver bei 23,5 Millionen Menschen [141].

Im Vergleich zu einfachen Retroviren kodieren Lentiviren zusätzlich regulatorische und akzessorische Proteine, die in den Genomen einfacher Retroviren nicht vorhanden sind, und können zudem sich nicht teilende Zellen infizieren. Das Genom von HIV-1 (Abbildung 1) mit einer Größe von etwa 9 kb kodiert ausgehend vom 5' Ende die viralen Proteine Gag (group-specific antigen), GagPol (polymerase) sowie das Oberflächenprotein Env (envelope glycoprotein).

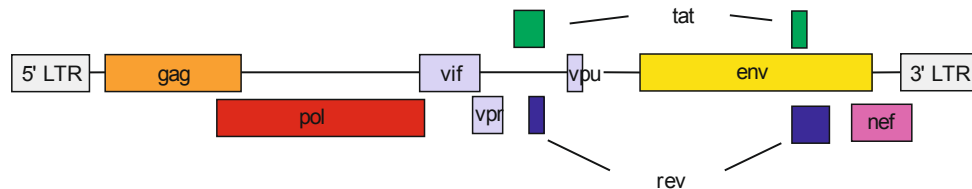


Abbildung 1: Genomaufbau und -struktur von HIV-1

Das provirale Genom von HIV-1 mit einer Größe von etwa 9 kb wird durch zwei LTR-Regionen flankiert und kodiert die viralen Proteine Gag, GagPol und das Oberflächenprotein Env sowie die regulatorischen Proteine Tat und Rev. Die kodierenden Bereiche der akzessorischen Proteine Vif, Vpr, Vpu und Nef vervollständigen das Genom.

Gag kodiert die viralen Strukturproteine Matrix, Capsid und Nucleocapsid, *GagPol* entsteht durch Leserahmenverschiebung während der Transkription des *gag*-Gens und beinhaltet die viralen Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase; die Oberflächenproteine gp120 und gp41 sind in *env* kodiert. Zudem verfügt das HIV-1 Genom über zwei regulatorische Proteine Rev und Tat sowie die akzessorischen Proteine Vpu, Vif, Vpr und Nef. Die Struktur der Viruspartikel ist in Abbildung 2 dargestellt.

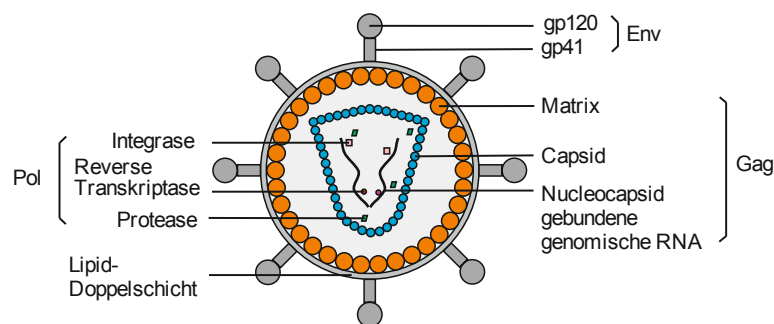


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines HIV-1 Viruspartikels

Die äußere Hülle des Viruspartikels bildet sich aus den Matrixproteinen, die sich zuvor an der Plasmamembran angelagert hatten. Weiterhin sind in der Membran die Oberflächenproteine gp120 und gp41 eingelagert. Im Inneren des Partikels befindet sich ein Capsid, in dem sich die viralen Enzyme sowie zwei Kopien der viralen, genomischen RNA befinden.

HIV-1 infiziert CD4⁺ T-Lymphozyten und Makrophagen. Der Viruseintritt erfolgt über die Bindung an den Oberflächenrezeptor CD4, sowie den Korezeptor CXCR4 oder CCR5. Nach der Fusion von Virus- und Plasmamembran tritt der virale Kern ins Cytoplasma der Wirtszelle ein, wo das virale RNA-Genom in doppelsträngige DNA umgeschrieben, dann in den Zellkern

transportiert und dort in ein Wirtszellchromosom integriert wird. Ausgehend vom integrierten Provirus können nun alle viralen RNAs synthetisiert werden. Nach Transkription und Translation sowie verschiedenen, bisher nicht gänzlich verstandenen Regulationsmechanismen kann die Partikelbildung durch Gag-Proteine an der Zelloberfläche erfolgen. Anschließend schnüren sich die neu gebildeten Viruspartikel von der Zelloberfläche ab und reifen zu infektiösen Partikeln, die wiederum weitere Zellen infizieren (Abbildung 3).

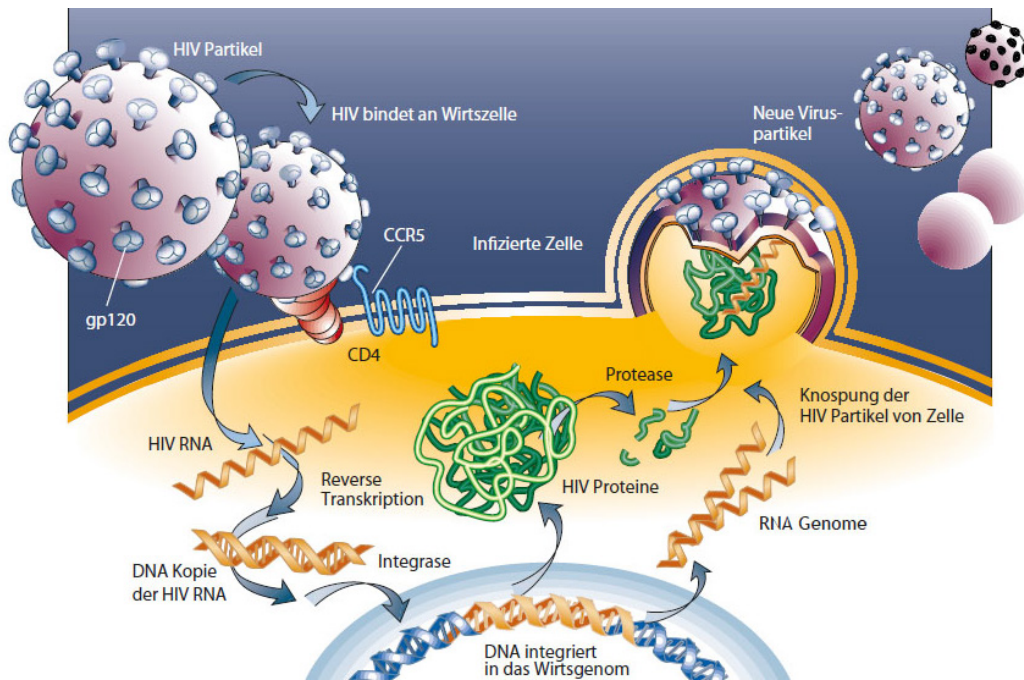


Abbildung 3: HIV Replikationszyklus (verändert nach [147])

Das virale Oberflächenprotein gp120 bindet an den CD4-Rezeptor sowie den CCR5-Korezeptor, wodurch im Folgenden die virale RNA in die Zelle gelangt. Die HIV-RNA wird durch die virale Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben, diese gelangt anschließend in den Zellkern und wird dort durch die virale Integrase ins Wirtszellgenom integriert. Die Transkription des HIV-Provirus erfolgt durch zelluläre Polymerasen. Nach erfolgter Translation der HIV-Proteine bilden sich aus Gag- und Env-Proteinen an der Zelloberfläche neue Viruspartikel, in die zwei RNA-Genome verpackt werden. Nach der Abschnürung der neuen Viruspartikel reifen diese weiter und können neue Zellen infizieren.

Gegen das HI-Virus gibt es bisher keine erfolgreiche Vakzine, die die Infektion mit dem Virus verhindert. Es stehen lediglich Medikamente zur Behandlung zur Verfügung, die keine Heilung ermöglichen, jedoch den Krankheitsverlauf und das Fortschreiten von AIDS verlangsamen. HAART (*highly active antiretroviral therapy*) kombiniert dabei meist drei Medikamente unterschiedlicher Wirkstoffklassen, wie Hemmern des Viruseintritts (Entryinhibitoren) sowie der viralen Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase oder Protease. Entryinhibitoren wirken durch Blockung des Korezeptors CCR5 oder des viralen Oberflächenproteins gp41, wodurch die Fusion des Viruspartikels mit der Zellmembran verhindert wird. Bei den Reverse Transkriptase-Inhibitoren werden Nukleotid- und Nukleosidanaloge RT-Inhibitoren (NRTI), die durch das Einbringen falscher oder funktionsunfähiger Bausteine zu einem Kettenabbruch bei der Virusreplikation führen, sowie nicht-nukleosidische RT-Inhibitoren (NNRTI), die das Enzym

direkt blockieren, unterschieden. Integrase- und Proteasehemmer inhibieren direkt die Wirkung des jeweiligen Enzyms. Eine erfolgreiche Therapie beeinträchtigt die Virusreplikation so stark, dass im Patienten kein Virus mehr nachweisbar ist, da die Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze gängiger Analysemethoden liegt. Allerdings kann eine solche Behandlung mit starken Nebenwirkungen verbunden sein, das Virus kann immer wieder Resistenzen gegen die verwendeten Medikamente ausbilden und aufgrund hoher Kosten ist die Behandlung insbesondere in armen Ländern nicht für jeden Infizierten verfügbar. Daher ist nach wie vor der einzige, effektive Schutz die Verhinderung einer HIV-Infektion. In der Forschung ist wiederum die Entwicklung einer effektiven Vakzine von großer Bedeutung, die dabei möglichst die Infektion verhindern soll, aber auch die Senkung der Viruslast wäre ein großer Erfolg.

Seit der Entdeckung des HI-Virus erfolgten zahlreiche Studien zur Impfstoffentwicklung, doch nur wenige dieser Ansätze erreichten klinische Studien. Insgesamt stellte sich dabei heraus, dass eine erfolgreiche Vakzine komplexe Immunantworten auslösen muss, die sowohl CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantworten als auch die Bildung neutralisierender Antikörper einschließt. Erschwert wird die Entwicklung einer solchen Vakzine beispielsweise durch die Hypervariabilität des Virus, die durch eine hohe Mutationsrate der viralen Reversen Transkriptase und Rekombinationen bedingt ist, dichte Glykosylierungen des Hüllproteins, was die Bildung von neutralisierenden Antikörpern erschwert, sowie das Fehlen eines geeigneten Kleintiermodells. Mit dem HI-Virus lassen sich neben Menschen lediglich Schimpansen infizieren, die aber nur selten AIDS ausbilden und zudem teuer und genetisch variabel sind, sodass Experimente mit Schimpansen heutzutage in Europa nicht mehr erfolgen; in den USA werden hingegen noch Experimente durchgeführt. Stattdessen haben sich andere Modelle mit verwandten Viren etabliert: große Ähnlichkeiten zur HIV-Infektion können in Rhesus-Makaken bei Infektion mit SIV oder SHIV beobachtet werden. Jedoch sind auch dabei die genetische Variabilität einzelner Versuchstiere sowie die begrenzte Anzahl zur Verfügung stehender Tiere problematisch. Daher wäre ein Mausmodell vorteilhaft, in dem genetisch identische sowie Knockout-Tiere zur Verfügung stehen, jedoch sind Mäuse nicht mit HIV infizierbar und es gibt auch kein nah verwandtes Virus in dieser Spezies. Allerdings wurden große immunologische Gemeinsamkeiten zwischen der HIV-Infektion im Menschen und der Friend Virus-Infektion in der Maus herausgestellt, sodass sich dieses Modell sowohl zur Erforschung der Immunologie der Virusinfektion als auch zur gezielten Impfstoffentwicklung eignet.

1.1.2 Friend Virus (FV)

Friend Virus (FV) gehört zu den γ -Retroviren und ist ein muriner, immunsuppressiver, retroviraler Komplex bestehend aus dem *spleen focus forming virus* (SFFV) und dem murinen Friend Leukämievirus (F-MuLV). Beide Viren besitzen einfache retrovirale Genome (Abbildung 4), wobei das des SFFV mehrere Deletionen enthält [20]. Dies hat Einfluss auf die Pathogenität

und Replikationsfähigkeit: Die Deletionen sorgen dafür, dass SFFV keine Partikel bilden kann und somit replikationsinkompetent ist. Weiterhin wird durch die Deletionen in *env* ein trunkiertes Env-Protein gebildet, das für die Pathogenität des SFFV verantwortlich ist. Nur das trunkierte Env kann mit dem Erythropoietin-Rezeptor interagieren, die Aktivierung des Rezeptors führt dann zu einer polyklonalen Erythroblastenproliferation, woraus sich schließlich eine Splenomegalie entwickelt (Abbildung 5). F-MuLV hingegen, dessen Genom keine Deletionen aufweist, ist replikationsfähig, aber nicht-pathogen.

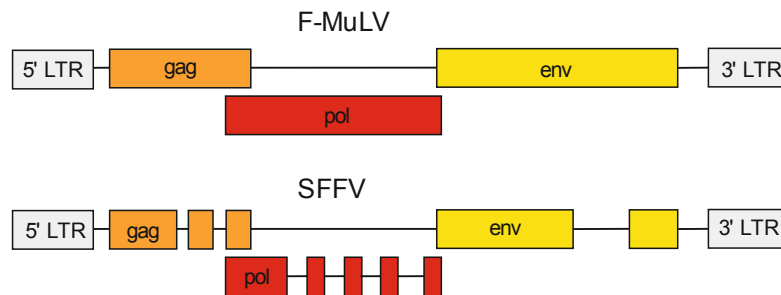


Abbildung 4: Genom von F-MuLV und SFFV

Beide Viren des FV-Komplexes, F-MuLV und SFFV, besitzen einfache retrovirale Genome bestehend aus den kodierenden Bereichen für die Strukturproteine Gag, Pol und Env. Das Genom des SFFV weist mehrere Deletionen auf.

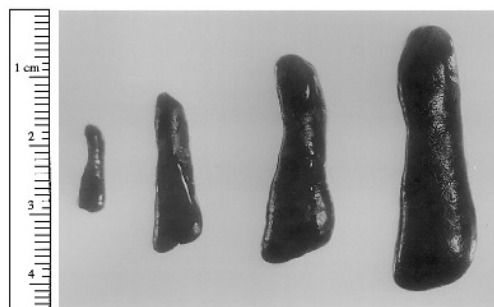


Abbildung 5: Splenomegalie durch FV-Infektion [58]

Suszeptible Mäuse bilden nach einer FV-Infektion eine Splenomegalie. Im Krankheitsverlauf kann sich diese verstärken; gezeigt sind verschiedene Stadien, ausgehend von einer nicht vergrößerten Milz (links) bis zu einer massiven Splenomegalie (rechts).

Neben einer Splenomegalie kann bei einer FV-Infektion auch eine Erythroleukämie entstehen. Diese ist bedingt durch den zufälligen Einbau des Provirus in das Wirtszellgenom, wodurch es zu einer Aktivierung des *ets*-Onkogens kommt, die dann zu einer Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 führt. Die Suszeptibilität gegenüber einer FV-Infektion hängt vom Mausstamm und damit verbunden von ihrem genetischen Hintergrund ab. Resistente Mäuse entwickeln keine Splenomegalie, sind aber auch nicht in der Lage, die Infektion vollständig zu eliminieren, sodass sich eine persistierende, chronische Infektion ausbildet. Welcher Infektionsverlauf sich entwickelt, hängt unter anderem vom MHC-Haplotyp ab. Über MHC, in der Maus auch H-2 genannt, werden virale T-Zellepitope präsentiert, wodurch zelluläre

Immunantworten gegen FV ausgebildet werden. Resistente Mäuse tragen dabei den H-2^b Haplotyp, susceptible Mäuse die Haplotypen H-2^d bzw. H-2^a [18]. Das Resistenzgen *fv-2* verringert die Erythroblastenproliferation, sodass entsprechende Mäuse weder Splenomegalie noch Erythroleukämie entwickeln. Dies ist darauf zurückzuführen, dass das Gen *fv-2* eine trunkierte Form der zellulären Stk-Kinase (sf-Stk) kodiert, die für die Interaktion zwischen dem SFFV-Env und dem Erythropoietinrezeptor verantwortlich ist [60, 110]. Das durch *Apobec3* kodierte *r fv3*-Gen beeinflusst die Ausbildung einer virusspezifischen Antikörperantwort [57].

Für die Verwendung der FV-Infektion als Kleintiermodell für retrovirale Infektionen sind dabei insbesondere die Mausstämmen C57BL/6 und Balb/c von Bedeutung. Bei C57BL/6 (H-2^{b/b}, Fv-2^{r/r}, Rfv3^{r/r}) handelt es sich um resistente Mäuse, die weder Leukämie noch Splenomegalie entwickeln, allerdings chronisch infiziert bleiben; Balb/c (H-2^{d/d}, Fv-2^{s/s}, Rfv3^{s/s}) hingegen bilden keine schützende zelluläre und humorale Immunantwort aus, sodass bei ihnen bereits geringe Infektionsmengen zu massiver Splenomegalie und Bildung einer Erythroleukämie führen, wodurch eine Infektion innerhalb weniger Wochen tödlich verläuft. Für die Entwicklung antiretroviraler Impfstoffe werden vorwiegend Mäuse mit mittlerer Suszeptibilität wie CB6F1-Mäuse (H-2^{b/d}, Fv-2^{r/s}, Rfv3^{r/s}) verwendet, die durch Kreuzung aus C57BL/6 und Balb/c entstanden sind.

1.2 Orthomyxoviren

Orthomyxoviren sind umhüllte Viren mit einem segmentierten RNA-Genom in Negativorientierung. Die Größe und Form der Viruspartikel sind dabei stark unterschiedlich. Die Übertragung der Orthomyxoviren erfolgt überwiegend durch virushaltige Aerosole und Tröpfchen, sodass sich die Viren hauptsächlich im Respirationstrakt vermehren. Der wohl bekannteste Vertreter der Familie der *Orthomyxoviridae* ist das Influenza A-Virus. Weiterhin gehören zu der Familie die Genera Influenza B und C sowie das Thogoto- und Dhorivirus. Letztere kommen hauptsächlich in Afrika, Asien und Südeuropa vor und werden vorwiegend durch Zecken übertragen.

1.2.1 Influenzaviren

Erste Hinweise auf das Influenzavirus als Erreger der Schweineinfluenza zeigte Richard Shope im Jahr 1931 [129], während Influenza A-Viren aus Menschen erstmals 1933 isoliert wurden [1]. Influenzainfektionen treten meist periodisch als Pandemie mit Ursprung in Südostasien und China auf, von wo aus sie sich weltweit ausbreiten und mit vielen Todesfällen verbunden sind. Durch die Infektion werden schwere Erkrankungen der Atemwege sowie des gesamten Organismus ausgelöst.

Influenzaviren werden aufgrund verschiedener molekularer Eigenschaften und der serologischen Charakterisierung verschiedener Proteine in die Typen A, B und C eingeteilt. Das

Genom der Influenzaviren A und B verfügt über 8 Segmente und kodiert die Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA), wohingegen das Genom von Influenza C nur aus 7 Segmenten besteht und die Eigenschaften der beiden Oberflächenproteine im Hämagglutinin-Esterase-Fusionsprotein (HEF) vereint. Die Virione von Influenzaviren haben hauptsächlich sphärische Formen und bestehen aus segmentierten Nucleocapsiden.

In der Hüllmembran sind die viruscodierten, glycosylierten Oberflächenproteine HA und NA als sogenannte *spikes* eingelagert. Die Aufgaben des HA-Proteins liegen in der Adsorption der Viren auf der Wirtszelloberfläche, sowie der Membranfusion und Agglutination von Erythrozyten. Das NA-Protein hingegen ist an der Freisetzung neusynthetisierter Viruspartikel beteiligt, was durch die Spaltung endständiger N-Acetyl-Neuraminsäuren von komplexen Kohlenhydraten ermöglicht wird.

Die antigenen Eigenschaften des Virus werden durch die Kombination verschiedener Hämagglutinine und Neuraminidasen bestimmt; bei Influenza A werden die Hämagglutinine H1 - H16 differenziert, die Unterschiede liegen dabei in der Aminosäuresequenz, ihrer Spaltbarkeit durch zelluläre Proteasen, der Rezeptorspezifität sowie ihrer Erkennung durch Antikörper. Bei der Neuraminidase werden die Subtypen N1 - N9 unterschieden. Antikörper gegen NA wirken neutralisierend, allerdings verhindern sie nicht die Bindung der Viren an den Rezeptor, sondern die Ausbreitung im Organismus. Problematisch sind die Neukombination verschiedener N- und H-Subtypen sowie die Überschreitung der Wirtsspezifität. Übertragungen von Influenzaviren von Geflügel oder Schweinen auf den Menschen sind bereits dokumentiert [99, 117]. Hinzu kommt, dass sich Influenzaviren durch Punktmutationen in antigenen Proteinbereichen (*antigenic drift*) sowie durch den Austausch einzelner Genomabschnitte (*antigenic shift*) an einen neuen Wirt adaptieren können. Weiterhin schützt die ausgebildete Immunität während einer Infektion lediglich gegen eine erneute Infektion desselben Subtyps.

Zur Vermeidung einer Influenzainfektion gibt es Impfstoffe, die allerdings aufgrund der beschriebenen Veränderungen des Virus jährlich verabreicht werden müssen. Dabei wird die Impfstoffzusammensetzung jeweils den aktuell vorhandenen Influenzaviren angepasst. Bei den Impfstoffen handelt es sich fast ausschließlich um Totimpfstoffe, ein Lebendimpfstoff war in Deutschland erstmals in der Influenzasaison 2012-2013 für Kinder im Alter von 2 - 17 Jahren zugelassen [8, 119].

1.3 Adenovirale Vektoren

Adenoviren gehören zur Familie der *Adenoviridae*, deren Partikel 80 - 100 nm groß sind und aus ikosaedrischen Capsiden ohne Membranhülle bestehen. Sie kodieren ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom (Abbildung 6) mit einer Größe von 36 - 38 kb, das aus 5 codierenden Bereichen besteht, wobei die Aktivierung der Bereiche E1 - E4 früh während der

Infektion erfolgt und die spät exprimierten Gene L1 - L5 für die Synthese der viralen Strukturproteine verantwortlich sind.

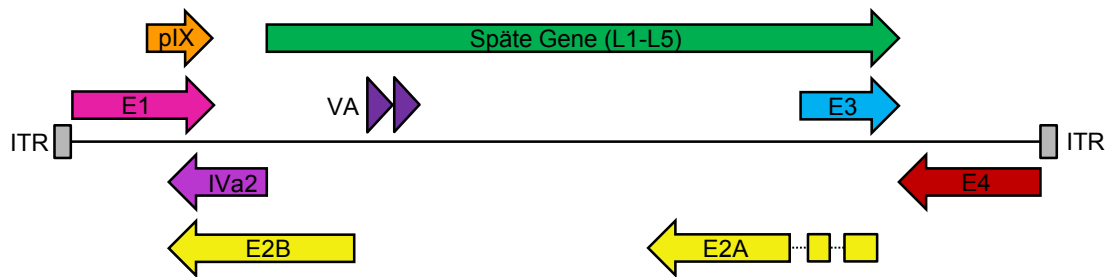


Abbildung 6: Schematischer Genomaufbau des humanen Adenovirus Typ 5

Das adenovirale Genom mit einer Größe von etwa 36 kb kodiert in 5 Transkriptionseinheiten über 40 verschiedene strukturelle und regulatorische Proteine sowie zwei nicht-translatierte RNAs (VA).

Adenoviren wurden erstmals im Jahr 1953 aus Tonsillen isoliert [121] und werden aufgrund ihres Wirtsspektrums in Mast-, Avi-, Si- und Atadenoviren eingeteilt. Die humanpathogenen Adenoviren gehören zur Gattung der Mastadenoviren, die sich in die Virusspezies A - F untergliedern; derzeit sind 51 Serotypen bekannt. Diese Serotypen ähneln sich insbesondere in der DNA-Sequenz und Genomorganisation, im Wirtstropismus sowie ihren Wachstums-eigenschaften in Zellkulturen.

Adenoviren lösen überwiegend Erkrankungen der Atemwege aus, können allerdings auch den Gastrointestinaltrakt sowie die Bindehaut des Auges infizieren; diese Infektionen verlaufen meist mild, können in immunsupprimierten Patienten in seltenen Fällen aber auch zum Tod führen.

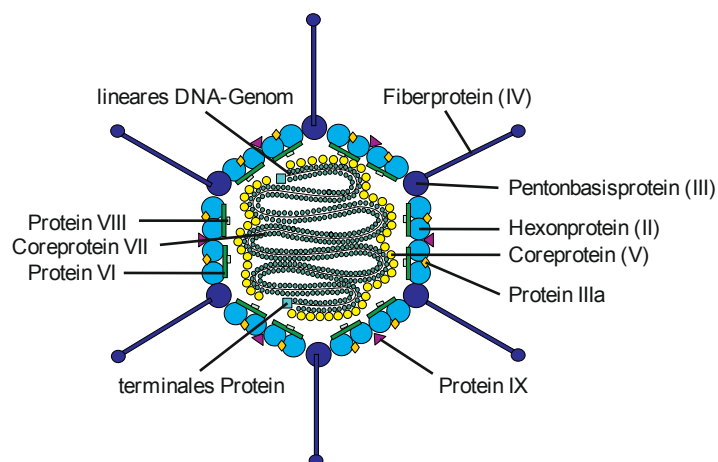


Abbildung 7: Struktur eines Adenoviruspartikels

Das nicht-umhüllte, ikosaedrische Adenoviruscapsid besteht hauptsächlich aus Hexonproteinen mit Pentonbasisproteinen an den Ecken, auf denen sich die Fiberproteine befinden.

Die Capside der Adenoviren setzen sich aus 20 Seitenflächen bestehend aus Hexonen zusammen, die an den Ecken über Pentone miteinander verbunden sind. An dem Pentonbasisanteil befinden

sich Fiberproteine, deren Schaftlänge, auf dem das Fiberknöpfchen sitzt, je nach Serotyp unterschiedlich lang ist. Weiterhin gibt es hexonassoziierte Proteine wie das Protein IX, das an Kontaktstellen einzelner Hexone auf der Partikeloberfläche vorkommt ([124], Abbildung 7).

Die Adsorption an einen zellulären Rezeptor wird über das Fiberprotein vermittelt [9]; bei diesem Rezeptor handelt es sich bei vielen humanen Adenoviren um den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) [159], der überwiegend auf Epithelzellen exprimiert wird [112]. Andere Adenoviren binden beispielsweise an CD46 [45].

Adenoviren werden häufig als Gentransfervektoren eingesetzt, da sie eine relativ große Transgenkapazität aufweisen und verschiedene Zelltypen effizient transduzieren können [153]. Zudem lassen sich adenovirale Vektoren in großen Konzentrationen und Mengen leicht herstellen. Unterschieden werden dabei Vektoren der ersten und zweiten Generation, *gutless*-Vektoren sowie onkolytische Vektoren. Bei frühen Vektoren wurde lediglich die E3-Region deletiert, was allerdings keinen Einfluss auf die Replikationsfähigkeit hatte [48]. Heutzutage werden hauptsächlich Vektoren der ersten Generation verwendet, die in der essenziellen Region E1 und optional in E3 deletiert sind, sodass die Vektoren ihre Replikationsfähigkeit in den meisten Zellen verlieren und eine Transgenkapazität von etwa 8,2 kb aufweisen [25]. Dabei muss die Funktion der E1-Region allerdings durch eine geeignete Verpackungszelllinie *in trans* bereitgestellt werden, wozu sich die Zelllinien HEK 293 [69] oder PerC6 [36] eignen. Bei Vektoren der zweiten Generation wurden zusätzlich die E2- und E4-Regionen deletiert, was zu einer Erhöhung der Transgenkapazität auf etwa 14 kb führte sowie die Attenuierung verbesserte [123]. Durch die fehlende Spätgenexpression verringerte sich zudem die Immunantwort gegen transduzierte Zellen. *Gutless*-Vektoren enthalten keinerlei kodierende Genombereiche, sondern lediglich Sequenzelemente, die für die Genomverpackung und -replikation notwendig sind, wodurch die Transgenkapazität auf bis zu 27 kb steigt. Diese Vektoren benötigen zur Verpackung allerdings einen Helfervirus, der neben der essenziellen E1-Funktion alle regulatorischen Elemente und Strukturgene beinhaltet, die für die Replikation notwendig sind [33, 76]. Die meisten zusätzlichen Deletionen früherer Gene haben dabei zur Folge, dass die Immunantwort gegen den adenoviralen Vektor reduziert und die Transgenexpression verlängert wird [33]. Die Hauptaufgabe von onkolytischen Vektoren ist die selektive Lyse von Tumorzellen. Hierfür gibt es die Möglichkeiten, ein essenzielles Gen unter die Kontrolle eines gewebe- oder tumorspezifischen Promotors zu stellen, den Tropismus zu verändern oder ein essenzielles Gen zu deletieren, dessen Funktion durch einen Defekt der Tumorzelle komplementiert wird [149-151].

Adenovirale Vektoren wurden bereits in zahlreichen Infektionen als Gentransfervektoren eingesetzt; dabei wird für Vakzinierungen und Gentherapien am häufigsten der humane Serotyp Ad5 verwendet [31, 142, 153]. Da dieser Virustyp allerdings häufig vorkommt und somit viele

Menschen bereits eine Präimmunität gegen diesen Subtyp besitzen, fanden in den letzten Jahren seltenere Virustypen wie Ad11, Ad35 oder Ad49 als Impfvektoren Verwendung [62, 78, 82]. Auch in der Tumorthherapie sind diese selteneren Virustypen von Interesse, da viele Tumorzellen den CAR-Rezeptor für Ad5 gar nicht oder nur in geringem Maß exprimieren [61].

1.4 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Körper vor Infektionen, die durch Pathogene wie Viren, Bakterien, Pilze oder sonstige Parasiten ausgelöst werden. Es besteht aus spezialisierten Zellen, die sich im Blut, im Gewebe, in Organen sowie im Lymphsystem befinden. Dabei ist es wichtig, dass das Immunsystem zwischen körpereigenen und fremden sowie harmlosen und potenziell schädlichen Einflüssen unterscheidet. Durch fehlerhafte Erkennung bzw. Funktion kommt es zu Immunschwächen, Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen oder Allergien. Das Immunsystem der Wirbeltiere wird unterteilt in eine unspezifische oder angeborene Immunabwehr sowie eine spezifische oder adaptive Immunabwehr.

1.4.1 Angeborene Immunität

Zur Abwehr von Fremdstoffen und Pathogenen verfügt das Immunsystem über verschiedene Mechanismen. Der ersten Abwehr dienen bereits mechanische bzw. natürliche Barrieren wie Häute und Schleimhäute bzw. Flüssigkeits- oder Luftströme entlang von Epithelien. Hinzu kommen chemische Barrieren, wie Fettsäuren, niedrige pH-Werte, Enzyme oder antibakterielle Peptide, sowie mikrobiologische Barrieren, wie die natürliche Zusammensetzung einer normalen Mikroflora.

Gelingt es einem Pathogen dennoch, die ersten Barrieren zu überwinden, und kommt es zu einer Infektion, reagiert zunächst die angeborene Immunabwehr, die allerdings nicht gegen bestimmte Erreger gerichtet ist, aber ein weiteres Eindringen bzw. die Vermehrung des Erregers erschweren kann. Hierzu wird eine zelluläre Abwehr in Form von phagozytischen Zellen durch das Erkennen genereller Merkmale der Pathogene (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*) aktiviert. Von besonderer Bedeutung sind dabei antigenpräsentierende Zellen (APC), zu denen dendritische Zellen, Makrophagen und auch B-Zellen gehören. Phagozyten, insbesondere Makrophagen, sind langlebig und setzen bei ihrer Aktivierung Cytokine und andere Mediatoren frei. Die aktivierten APCs phagozytieren das Pathogen, wodurch sich ein Phagosom bildet, das anschließend zu einem Phagolysosom wird und in dem dann durch saure Hydrolyse durch das Enzym Lysozym das Pathogen verdaut wird. Anschließend werden verdaute Peptide auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zelle auf MHC II-Molekülen (*major histocompatibility complex*) präsentiert, durch die dann die Aktivierung von Zellen der adaptiven Immunität erfolgen kann.

Zudem tragen NK-Zellen durch die Freisetzung von lytischen Granula dazu bei, dass virusinfizierte oder Tumorzellen getötet werden. Dabei werden Zellen erkannt, die keine, fremde, wenige oder veränderte MHC I-Moleküle tragen.

1.4.2 Adaptive Immunität

Beim erworbenen Immunsystem spielen T- und B-Zellen wichtige Rollen, die für die zellvermittelte oder humorale Immunantwort verantwortlich sind.

Wird ein Fremdpathogen erkannt und von antigenpräsentierenden Zellen auf ihrer Oberfläche über MHC II präsentiert, führt dies zur Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen, die auch T-Helferzellen (T_H) genannt werden. Diese T-Helferzellen stellen dann ihre Hilfe für cytotoxische CD8⁺ T-Zellen (CTL, *cytotoxic T-lymphocyte*), die virusinfizierte Zellen durch die Präsentation fremder Peptide über MHC I erkennen und diese durch ihre cytotoxische Aktivität eliminieren können, oder aber für B-Zellen zur Verfügung, die wiederum zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen differenzieren können.

Dabei unterscheiden sich die MHC-Moleküle I und II in wichtigen Parametern. Über MHC I werden Peptide aus dem Cytosol, also endogene Peptide, mit einer Größe von 8 - 10 Aminosäuren, präsentiert, die im endoplasmatischen Retikulum beladen werden. Exogene Peptide aus Vesikeln werden hingegen über MHC II präsentiert (vgl. Antigenpräsentation Kap. 1.4.1), deren Beladung in den intrazellulären Vesikeln erfolgt. Weiterhin befinden sich MHC I-Komplexe auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers, während MHC II ausschließlich auf spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen vorkommt.

Im Folgenden werden einzelne Zelltypen und Mechanismen, die für diese Arbeit besonders relevant sind, näher erläutert.

1.4.2.1 CD4⁺ T-Zellen

CD4⁺ T-Lymphozyten, auch T-Helferzellen (T_H) genannt, sind wichtige Zellen des Immunsystems. Ursprünglich wurden nur zwei Subpopulationen differenziert [96], T_H1 und T_H2-Zellen, die sich in ihren Funktionen voneinander unterscheiden. Während T_H1-Zellen eine Rolle bei der Aktivierung cytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) spielen, dienen T_H2-Zellen zur Aktivierung von B-Zellen, was zu einer verstärkten Antikörperproduktion führt. In den letzten Jahren wurde diese Einteilung jedoch durch weitere Subpopulationen wie T_H17- Zellen, regulatorischen, follikulären sowie cytotoxischen CD4⁺ T-Zellen ergänzt. Dabei hängt die Ausbildung einer T-Helferzellsubpopulation maßgeblich vom gegenwärtigen Cytokinmilieu ab (Abbildung 8).

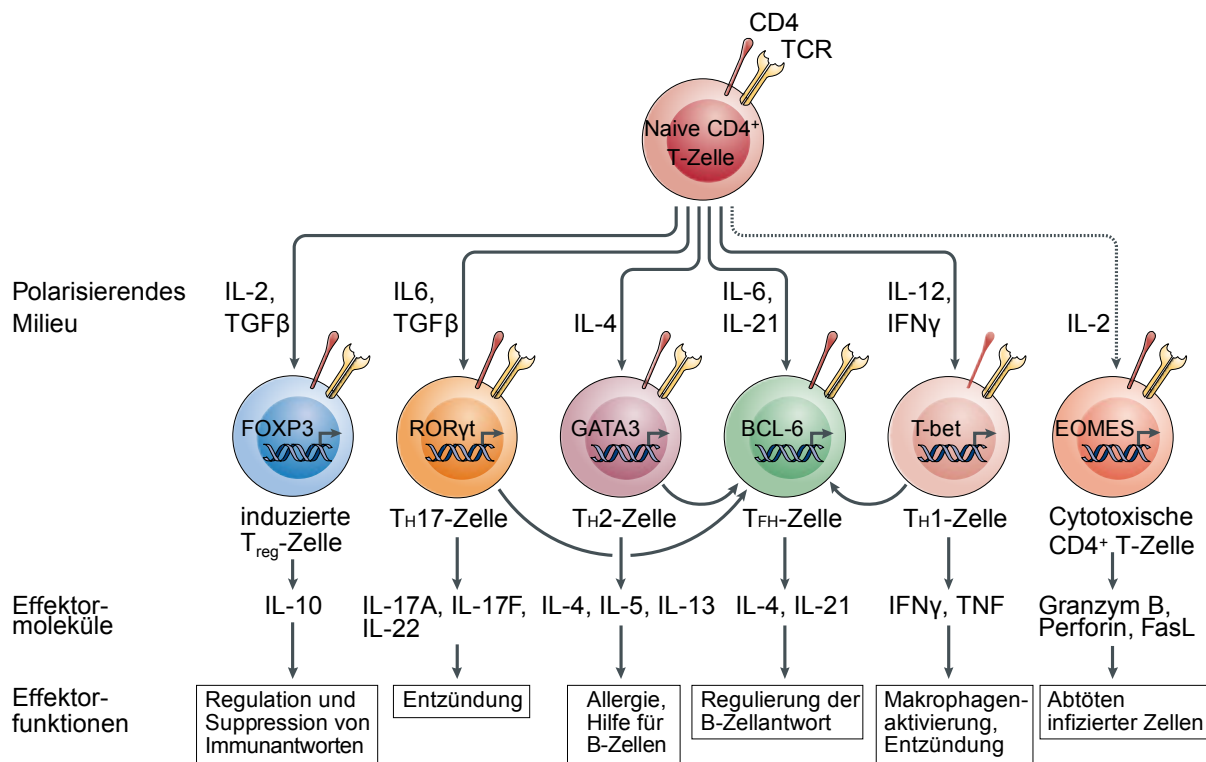


Abbildung 8: Differenzierung der CD4⁺ Subpopulationen (verändert nach [133])

Bedingt durch das vorhandene Cytokinmilieu werden in einer naiven CD4⁺ T-Zelle charakteristische Transkriptionsfaktoren aktiviert, sodass die CD4⁺ T-Zellen in unterschiedliche Subpopulationen differenzieren und die entsprechenden Effektorfunktionen ausüben.

Die gegenwärtigen Cytokine führen über den JAK-STAT-Signalweg zur Aktivierung des jeweiligen Transkriptionsfaktors, wodurch die naiven T_H0-Zellen in den entsprechenden Subtyp differenzieren und ihre Effektorfunktionen übernehmen. Gleichzeitig wird dabei auch die Differenzierung zu anderen Subtypen inhibiert.

In Gegenwart von den Cytokinen IL12 und IFNγ differenzieren naive T_H0-Zellen zum T_H1-Phänotyp. Dabei interagiert IL12 mit den naiven T_H-Zellen, um STAT4 zu aktivieren, was zur Expression des Transkriptionsfaktors *T-box expressed in T-cells* (T-bet) führt. Dieser Faktor ist der Hauptregulator bei der Differenzierung von T_H1-Zellen. Durch die Differenzierung kommt es zur Produktion von IFNγ [95], das über STAT1 agiert und so die Expression von T-bet weiter steigert, zusätzlich aber auch die Differenzierung anderer Subtypen wie T_H2 und T_H17 inhibiert [22]. Bei der Immunantwort auf virale Infektionen werden hauptsächlich T_H1-Antworten generiert [22], die bei der Ausbildung von cytotoxischen CD8⁺ T-Zellantworten helfen.

Die Differenzierung des T_H2-Phänotyps erfolgt durch Interleukin 4. IL4 aktiviert dabei STAT6, das die Expression von GATA-3 (*GATA-binding protein 3*) induziert, gleichzeitig aber auch die Expression von T-bet supprimiert. Im Weiteren verstärkt GATA-3 die IL4-Expression, wodurch

die Polarisierung weiter verstärkt wird. T_H2-Lymphozyten tragen zur Aktivierung von B-Zellen und somit zur Induktion humoraler Immunantworten bei. Außerdem produzieren T_H2-Zellen die Interleukine IL4, IL5 und IL13, wodurch allergische und antiparasitäre Immunantworten induziert werden [22].

Die Cytokine IL6 und TGFβ tragen zur Differenzierung von T_H17-Zellen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors RORγt bei [63], die selektiv das Interleukin IL17 produzieren [30]. T_H17-Zellen sind wichtig bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort gegen extrazelluläre Pathogene und sind wahrscheinlich bei Autoimmunerkrankungen involviert [22]. Ihre Rolle bei Virusinfektionen ist nicht gut verstanden. Bei der Autoimmunität lösen sie schädliche Entzündungen aus und tragen bei der Antwort auf Virusinfektionen zur Immunpathologie bei [24, 108].

Interleukin 6 ist zusätzlich, gemeinsam mit IL21, an der Differenzierung von follikulären T-Helferzellen (T_{FH}) beteiligt. T_{FH}-Zellen sind spezialisierte B-Zellhelfer [133], die schrittweise die Entwicklung einer Antigen-spezifischen B-Zellantwort regulieren [38]. IL6 induziert dabei über STAT3 die Aktivierung des Transkriptionsfaktors BCL-6 (*B cell lymphoma 6*), was zur Produktion von IL21 führt [107].

Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) sind negative Regulatoren des Immunsystems. Sie wirken einer cytotoxischen T-Zellantwort entgegen, um auf diese Weise eine Überreaktion gegen das Pathogen zu verhindern und den Organismus vor der Selbstschädigung zu schützen [125]. Naive T-Helferzellen differenzieren in Gegenwart von IL2 und TGFβ zu regulatorischen T-Zellen. Der Transkriptionsfaktor ist Foxp3 (*forkhead box protein 3*), dessen Aktivierung insbesondere die Expression von IL10 steigert [133].

Zuletzt wurden auch CD4⁺ T-Zellen beschrieben, die cytotoxisches Potenzial besitzen. Der zugehörige Transkriptionsfaktor ist Eomes (eomesodermin), der durch die membranständigen kostimulatorischen Rezeptoren CD134 (OX40) und CD137 (4-1BB) induziert wird. Diese CD4⁺ T-Zellen induzieren durch cytotoxische Mechanismen die Apoptose virusinfizierter Zellen [133].

1.4.2.2 CD8⁺ T-Zellen

Cytotoxische CD8⁺ T-Zellen (CTL, *cytotoxic T-lymphocyte*) können virusinfizierte Zellen, die virale Peptide über MHC I-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentieren, erkennen und eliminieren sowie antivirale Funktionen durch die Expression entsprechender Cytokine ausüben.

Das cytotoxische Potenzial der CD8⁺ T-Zellen kann über zwei voneinander unabhängige Mechanismen vermittelt werden, die beide die Apoptose der Zielzelle induzieren. Beim Granula-Exocytose-Weg werden lytische Granula freigesetzt, die Granzyme und Perforine enthalten. Granzyme sind Serinproteasen, das am besten untersuchte Granzym ist Granzym B (GzmB). Für

die Apoptoseinduktion muss GzmB zunächst in die Zielzelle gelangen; hierzu kann Perforin kalziumabhängige Membranschäden verursachen. Durch die dabei entstehenden Kanäle kann GzmB durch die Membran diffundieren und gelangt so in die Zielzelle, wo es seine proapoptotische Wirkung ausüben kann. Bei einer weiteren Möglichkeit, die diskutiert wird, gelangt GzmB durch endosomale Vesikel in die infizierte Zelle. Die Freisetzung aus den Vesikeln erfolgt dann über Perforin, ein Mechanismus ist hierfür allerdings noch unbekannt.

Eine zweite Möglichkeit stellt die Fas-vermittelte Apoptoseinduktion dar. Die cytotoxische CD8⁺ T-Zelle besitzt FasL auf der Zelloberfläche und kann damit an den Fas-Rezeptor auf einer Zielzelle binden. Dadurch kommt es zur Aktivierung von Caspasen, wodurch im Weiteren die Apoptose in der Zielzelle induziert wird [101].

Weiterhin exprimieren cytotoxische CD8⁺ T-Zellen IFN γ und in geringeren Mengen auch TNF α sowie weitere Cytokine. Durch IFN γ wird die Expression von MHC I erhöht und damit die Antigenpräsentation stimuliert [43]. Weiterhin erhöht IFN γ die Cytokinproduktion durch antigenpräsentierende Zellen [22], aktiviert Makrophagen [115] oder inhibiert die Replikation eines Pathogens [54].

TNF α ist ein proinflammatorisches Cytokin, das direkt cytotoxische Effekte ausüben kann. Durch die Bindung dieses Cytokins an den TNF-Rezeptor 1 wird der Zelltod der Zielzelle induziert [145].

1.4.2.3 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten sind neben T-Lymphozyten die entscheidenden Zellen der adaptiven Immunantwort. B-Lymphozyten, die Vermittler der humoralen Immunantwort, sind die einzigen Zellen, die Antikörper produzieren und freisetzen können. Die Entwicklung dieser Zellen erfolgt im Knochenmark. Ausgehend von der hämatopoetischen Stammzelle durchlaufen B-Zellen während ihrer Entwicklung verschiedene Stadien im Knochenmark, bei denen insbesondere die Bildung eines funktionellen B-Zellrezeptors von Bedeutung ist; ohne einen solchen Rezeptor können reife B-Zellen keine fremden Antigene erkennen und somit auch keine Antikörper gegen diese bilden. Die ersten Zellen, die einen kompletten B-Zellrezeptor (IgM) tragen, werden als unreife B-Zellen bezeichnet. Anschließend verlassen die B-Zellen das Knochenmark und zirkulieren als naive B-Zellen im Blut und in den sekundären lymphatischen Geweben; naive B-Zellen sind reife B-Zellen, die noch keinen Kontakt zu einem Antigen hatten. Für eine Aktivierung dieser Zellen sind zwei Signale erforderlich: als ein erstes Signal dient der Kontakt zu einem fremden Antigen, an das der B-Zellrezeptor (BCR, *B-cell receptor*) bindet und gegen das anschließend die Antikörper gebildet werden. Durch den Antigenkontakt wird dabei das Antigen von der B-Zelle aufgenommen und nach Prozessierung über MHC II auf der Oberfläche präsentiert. Allerdings reicht dieses eine Signal für eine vollständige Aktivierung nicht aus. Zusätzlich zu einem Antigen wird zur Aktivierung ein weiteres kostimulierendes Signal benötigt.

Dieses stammt von einer T-Helferzelle, die das auf der B-Zelle präsentierte Antigen erkennt und an den Antigen-MHC-Komplex bindet, wodurch die B-Zelle vollständig aktiviert wird. Nach der Aktivierung wandert die B-Zelle zu sogenannten Keimzentren in Lymphknoten oder Milz, wo sie polyklonal expandiert und anschließend in Antikörper-produzierende Plasmazellen differenziert. Differenzierte Plasmazellen verlieren dabei ihren MHC II-Rezeptor, sodass diese nicht mehr aktiviert werden können.

1.4.3 Cytokine

Cytokine sind Hormone des Immunsystems, die durch ihre vielfältigen Eigenschaften maßgeblich an der Aktivierung und Funktion des Immunsystems mitwirken. Cytokine haben ein Molekulargewicht von etwa 25 kDa, werden von unterschiedlichen Zellen, wie APCs, T- und B-Zellen sowie Mastzellen freigesetzt und binden an spezielle Rezeptoren. Auch die Funktionen sind vielfältig und können in natürliche Immunität, Aktivierung, Wachstum und Differenzierung von Lymphozyten, Aktivierung von Entzündungszellen und Aktivierung der Hämatopoese eingeteilt werden. Strukturell werden bei Cytokinen drei Hauptfamilien unterschieden, die Hämatopoetin-Familie, die TNF-Familie sowie die Chemokin-Familie. Cytokine können eine autokrine, parakrine oder endokrine Wirkung haben, zudem gibt es redundante Funktionen und pleiotrope Wirkungen. Bei einer redundanten Funktion handelt es sich um eine Funktion, die durch verschiedene Cytokine ausgelöst werden kann; hat ein Cytokin mehrere Effekte, so wird dies als pleiotrope Wirkung bezeichnet. Die Ausübung einer biologischen Funktion erfolgt bei Cytokinen zunächst durch ihre Bindung an einen Rezeptor, wodurch eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst wird, die schließlich im Zellkern zu einer Genaktivierung führt, wodurch dann die biologische Funktion ausgelöst wird.

1.4.3.1 Interleukine

Interleukine sind eine große Gruppe von immunmodulatorischen Cytokinen, die vielfältige Immunantworten in Zellen und Geweben auslösen. Sie sind beteiligt an der Zellproliferation, Reifung, Migration und Adhäsion und spielen zudem wichtige Rollen bei der Differenzierung und Aktivierung von Immunzellen [16]. Der Begriff „Interleukin“ stammt aus dem Jahr 1979 zur Beschreibung sekretierter Moleküle, die von Leukozyten produziert wurden und zwischen diesen (lat. inter) wirkten [2]. Interleukine können pro- und anti-inflammatorische Effekte ausüben und wirken hauptsächlich in autokriner oder parakriner Weise. Aufgrund einer konstanten Anpassung zwischen dem Immunsystem des Wirts und dem infizierenden Organismus entwickeln sich Interleukine kontinuierlich weiter, was zu einer hohen sequenziellen Divergenz führt [16].

Im Folgenden werden einzelne Interleukine, die im Rahmen dieser Arbeit wichtig sind, näher beschrieben.

Interleukin 4 (IL4) ist der Hauptwachstumsfaktor von T_H2-Lymphozyten und spielt daher bei der Differenzierung dieser Subpopulation eine wichtige Rolle. Weiterhin ist IL4 bei Allergien von besonderer Bedeutung, indem es den Antikörper-Klassenwechsel von IgM zu IgE induziert [21]. Zudem verstärkt IL4 das Überleben und die Proliferation von B-Zellen [143].

Interleukin 5 (IL5) wurde ursprünglich als „T-cell replacing factor“ beschrieben [134], der von T-Zellen sezerniert wird und die Antikörperproduktion aktivierter B-Zellen stimuliert. Zudem induziert IL5 die terminale Differenzierung aktivierter B-Zellen in Antikörper-sezernierende Plasmazellen [79]. IL5 wird dabei insbesondere von T_H2-Zellen produziert [79]. Darüber hinaus ist IL5 ein Wachstums- und Differenzierungsmarker von Eosinophilen [136].

Interleukin 6 (IL6) ist ein pleiotropes Cytokin mit vielseitigen biologischen Aktivitäten in der Immunregulation, Hämatopoese, Entzündung und Onkogenese [74]. In Bezug auf B-Lymphozyten ist IL6 an der Differenzierung zu reifen Plasmazellen sowie der Sekretion von Immunglobulinen beteiligt [22, 50], weshalb IL6 ursprünglich auch als B-Zell-stimulierender Faktor-2 (*B-cell stimulatory factor-2*) bezeichnet wurde [74]. Weiterhin vermittelt IL6 die Aktivierung, das Wachstum und die Differenzierung von T-Lymphozyten [22] und ist essenziell bei der Differenzierung von T_H17-Zellen [11].

Interleukin 7 (IL7) trägt zur Reifung von B-Lymphozyten im Knochenmark bei. Dabei induziert IL7 im Stadium der späten Pro-B-Zelle die Proliferation und Differenzierung der Pro-B-Zelle zur Prä-B-Zelle [135]. Darüber hinaus wird IL7 von Stromazellen im Knochenmark und Thymus produziert, wo es mit den Vorläuferzellen der B- und T-Lymphozyten interagiert und somit eine wichtige Rolle bei der Entwicklung dieser Zellen spielt [22]. IL7 agiert zudem als Wachstums- und Überlebensfaktor von T-Zellen [75]; durch die Gabe von rekombinantem IL7 steigt die T-Zellanzahl in Mäusen an [46].

Das heterodimere Interleukin 23 (IL23) gehört zur Familie der IL12-Interleukine und teilt sich mit IL12 die große Untereinheit p40. IL23 ist an der Aktivierung von T-Zellen und der Ausbildung von T_H1- und T_H17-Antworten beteiligt [14, 22], führt allerdings nicht zur Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H17-Zellen [11, 87]. Zudem ist IL23 wichtig für das Überleben und die Funktion von T-Gedächtniszellen [109].

1.4.3.2 Chemokine

Chemokine sind eine Gruppe kleiner Proteine (8 - 12 kDa), die an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden und in der Lage sind, Zellmigration und Chemotaxis in vielen Zelltypen zu induzieren [22]. Bisher wurden 52 Chemokine und 20 Chemokinrezeptoren beschrieben [94, 161]. Dies hat zur Folge, dass verschiedene Chemokine an den gleichen Rezeptor binden können, was zu redundanten Funktionen führt.

Chemokine werden in 4 Familien eingeteilt; die Klassifikation erfolgt in Abhängigkeit der Position eines N-terminalen Cysteinrests. Innerhalb einer Subfamilie wird so eine identische Aminosäuresequenz von 30 - 90 % erreicht, wohingegen sich die verschiedenen Subfamilien deutlich voneinander unterscheiden (Sequenzhomologie < 30 %) [22]. Die beiden größten Familien sind die CC- und die CXC-Familie. Bei der CC-Familie folgen zwei Cysteine unmittelbar aufeinander, während diese bei der CXC-Familie durch eine beliebige Aminosäure (X) voneinander getrennt sind. Weiterhin gibt es die C-Familie, die lediglich einen Cysteinrest enthält, sowie die CX3C-Familie, bei der die beiden Cysteinreste durch drei Aminosäuren getrennt sind.

Die Hauptaufgabe der Chemokine ist die Steuerung von Lymphozyten zu einem Entzündungsherd. Dabei ist wichtig zu betrachten, welche Zellen welche Chemokinrezeptoren exprimieren, um auf diese Weise herauszustellen, welche Chemokine auf welche Zellen wirken können. T_H2-Zellen exprimieren die Chemokinrezeptoren CCR3, CCR4 und CCR8 [72]. CCL22 ist ein Ligand des Rezeptors CCR4 [13] und das Chemokin CCL1 bindet an den Rezeptor CCR8 [160]. Diese Chemokine sind folglich an der Steuerung von T_H2-vermittelten Immunantworten beteiligt. B-Zellen hingegen exprimieren den Rezeptor CXCR5, an den das Chemokin CXCL13 bindet [81]. Darüber hinaus kann CCL22 eine bestehende T_H2-Antwort weiter verstärken [88]. CXCL13 induziert die Bildung von Keimzentren, indem es die Migration von B-Zellen zu den Follikeln der sekundären lymphatischen Organe steuert [72].

1.5 Immunisierungsstrategien

Immunisierungen dienen dem Schutz eines Organismus vor einer späteren Erkrankung mit einem entsprechenden Erreger. Unterschieden werden dabei aktive und passive Immunisierungen. Die Gabe von Immunglobulinen, die passive Immunisierung, kann ein bestimmtes Virus kurz nach der Exposition neutralisieren, die Antikörper sind allerdings nur kurzlebig und werden daher nur in besonderen Fällen eingesetzt. Bei der aktiven Immunisierung wird eine schützende Immunantwort im Organismus induziert, die einen langanhaltenden Schutz bietet und sowohl durch Lebend- als auch Totimpfstoffe erzeugt werden kann; die unterschiedlichen Ansätze für Vakzinkandidaten sind dabei vielseitig.

Lebendimpfstoffe sind replikationsfähige Erreger, die sich im Impfling vermehren und virale Proteine erzeugen. Dabei werden sowohl spezifische neutralisierende Antikörper sowie cytotoxische T-Zellantworten induziert. Zu ihnen zählen attenuierte Viren, replikationskompetente virale Vektoren sowie Jennersche Vakzinen.

Attenuierte Viren lösen aufgrund von Mutationen im Wildtypgenom nur noch begrenzte oder abgeschwächte Infektionen aus, erzeugen aber dennoch meist einen lang anhaltenden, sehr guten Impfschutz mit humoralen und zellvermittelten Immunantworten [89]. Allerdings ist

durch das Risiko der Rückmutation zur Wildtypform und Rekombinationen je nach Pathogenität des Virus die Sicherheit nicht gewährleistet [148].

Auch rekombinante, replikationsfähige Viren wie Vacciniaviren können als Lebendimpfstoff verwendet werden, wodurch ebenfalls sowohl humorale als auch zellvermittelte Immunantworten ausgelöst werden. Hierbei wird das gewünschte Transgen unter die Kontrolle eines Vacciniapromotors gestellt; dabei kann allerdings aufgrund der begrenzten Verpackungskapazität des viralen Vektors nicht, wie beim Einsatz eines gesamten Virus, die vollständige Immunantwort gegen das Virus erzeugt werden. Somit müssen einzelne Gene oder Epitope gezielt ausgesucht werden, gegen die dann die Immunantwort gerichtet sein soll.

Edward Jenner überschritt mit seinen Impfungen im 18. Jahrhundert die Speziesbarriere der Pockenviren und impfte Menschen mit dem Kuhpockenvirus, wodurch sich eine schützende Immunantwort ausbildete [91].

Zu den Totimpfstoffen, die sich im Organismus nicht mehr vermehren können, gehören abgetötete Wildtypviren, nicht-replizierende virale Vektoren, sowie Protein-, Peptid- und DNA-Impfstoffe.

Durch Chemikalien abgetötete Wildtypviren behalten ihre Form und Struktur teilweise bei, weisen aber keine Pathogenität mehr auf; es ist jedoch zu beachten, dass teilweise auch die Nukleinsäuren allein infektiös sind.

Zu den replikationsinkompetenten viralen Vektoren gehören beispielsweise adenovirale Vektoren. Auch hierbei, wie bei den replikationsfähigen viralen Vektoren, wird das gewünschte Transgen unter die Kontrolle des vektorspezifischen Promotors gestellt. Adenovirale Vektoren können sich aufgrund von Deletionen im adenoviralen Genom nicht mehr vermehren.

Eine weitere Möglichkeit stellen Proteinimpfstoffe, die gegen viele Infektionskrankheiten eingesetzt werden und neutralisierende Antikörper induzieren, oder Peptidimpfstoffe dar; die Induktion cytotoxischer T-Zellantworten erfolgt dabei nur selten, da hierfür aufgrund der Replikationsdefizienz die aktive Proteinsynthese fehlt. Es werden einzelne Proteine bzw. Epitope verwendet, die jedoch allein kaum immunogen sind, sodass Wiederholungsimpfungen, die die ausgebildete Immunantwort erhalten, sowie die Zugabe eines geeigneten Adjuvans zur Steigerung der Immunantwort erforderlich sind. Diese Impfstoffe sind sehr sicher, weil sie lediglich aus einzelnen Viruskomponenten bestehen und keine Nukleinsäuren enthalten. Zu den Proteinimpfstoffen zählen auch partikelbildende Proteine wie das HBsAg des Hepatitis B-Virus [51] oder das Capsidprotein L1 des Humanen Papilloma-Virus [35].

Weiterhin kommen DNA-Impfstoffe zum Einsatz; dabei handelt es sich um bakterielle Plasmide, die ein Fremdgen enthalten. Bei der Gabe von Plasmiden spielt für die Ausbildung einer schützenden Immunantwort die Applikationsmethode eine entscheidende Rolle. Die Immunogenität der Plasmid-DNA kann durch Verpackung in Liposomen oder Nanopartikel gesteigert werden. Zudem können Goldpartikel mit der Plasmid-DNA beschichtet und

anschließend mithilfe einer Genkanone (*gene gun*) injiziert werden. Auch die Applikation der Plasmid-DNA durch elektrische Impulse durch Elektroporation kommt zum Einsatz.

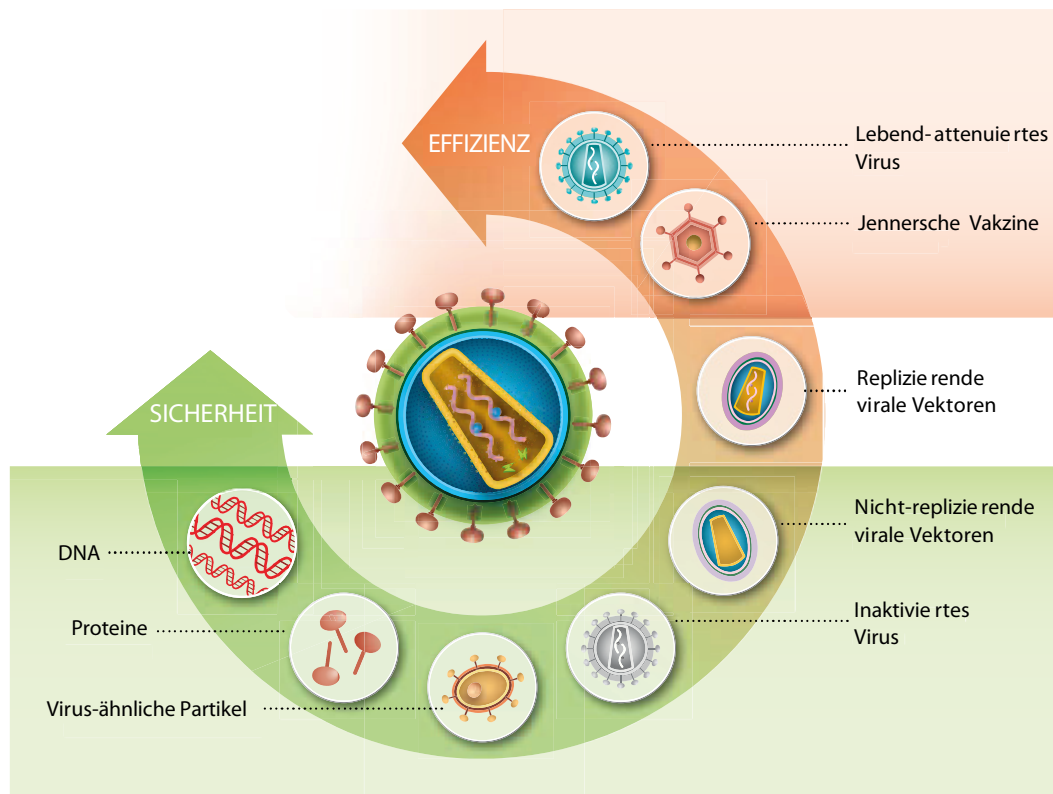


Abbildung 9: Sicherheit und Effizienz verschiedener Immunisierungsmöglichkeiten (verändert nach [65])

Für Vakzinierungen stehen viele verschiedene Strategien zur Verfügung. Lebend-attenuiertes Virus ist sehr effizient bei der Ausbildung einer schützenden Immunantwort, ist aber mit einem Sicherheitsrisiko verbunden (rot). Weiterhin gibt es vielfältige experimentelle Ansätze, die sehr sicher aber nicht so effektiv sind (grün).

Bei der Wahl einer geeigneten Vakzine muss stets die Balance zwischen Effizienz und Sicherheit berücksichtigt werden (Abbildung 9). Hocheffiziente, attenuierte Viren induzieren bei der Vakzinierung gegen retrovirale Infektionen einen sehr guten Schutz, bieten aber keine ausreichende Sicherheit; die Verwendung von Peptidimpfstoffen hingegen ist sehr sicher, aber nicht effizient genug. Zur Steigerung der Immunogenität einer Vakzine stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die wiederholte Verabreichung einer oder auch verschiedener Impfstoffe, eine sogenannte Prime-Boost-Immunisierung, hat eine verbesserte Effizienz zur Folge [116, 128, 137]. Auch der Einsatz von Adjuvanzen führt zu einer Steigerung der Immunogenität. Die wohl bekanntesten Adjuvanzen sind das Freund'sche Adjuvans, eine Emulsion aus Mineralöl und Wasser, die zudem abgetötete Mycobakterien enthält, sowie Alum (Aluminiumhydroxid). Durch die Verwendung dieser Adjuvanzen bleibt der Impfstoff länger im Gewebe, was zu einer erhöhten Aufnahme durch Makrophagen führt, kostimulatorische Moleküle werden exprimiert und dadurch weitere Immunzellen angelockt. Allerdings lösen diese Adjuvanzen teils heftige Entzündungsreaktionen sowie Gewebeschäden aus, sodass auf

ihre Verwendung möglichst verzichtet werden sollte. Stattdessen gibt es verschiedene Ansätze genetischer Adjuvazien, die eine gezielte Steigerung der Immunogenität bewirken. Beispiele sind der Einsatz von koapplizierten oder koexprimierten Cytokinen [68, 100, 102, 130] oder Toll-like-Rezeptor-Liganden [111]. Weiterhin besteht die Möglichkeit, die Immunogenität eines Epitops durch die Fusion an ein stimulatorisches bzw. hoch-immunogenes Molekül zu steigern. Hierzu eigneten sich das Tumorantigen HER2/neu [26], Moleküle wie CTLA-4 [103] und CD40L [3] sowie die Komplementproteine C3d [85, 156] und C4b [40]. Auch das Enzym Thioredoxin, das Monozyten, polymorphkernige Leukozyten und T-Lymphozyten anlocken kann, wurde aufgrund der immunstimulatorischen Wirkung als Adjuvans verwendet [122].

1.5.1 Impfstoffentwicklung gegen retrovirale Infektionen

Die Entwicklung einer effizienten und gleichzeitig sicheren Vakzine gegen eine HIV-Infektion ist trotz intensiver Forschung und diverser Studien bisher nicht gelungen. Während zahlreiche Vakzinkandidaten in präklinischen Studien getestet wurden, erreichten nur wenige von ihnen klinische Studien in Phase IIb oder III. Nachdem bereits früh klar war, dass ein lebend-attenuiertes Virus für eine HIV-Impfung zu gefährlich ist [37], stellte sich bereits in der ersten Phase III Studie heraus, dass reine Proteinimpfstoffe bestehend aus rekombinanten Oberflächenproteinen gp120 keinen Schutz induzieren [39, 56, 113]. In einer Phase IIb Studie, bekannt als STEP-study, wurden adenovirale Vektoren verwendet, die die viralen Proteine Gag, Pol und Nef kodierten und lediglich zellvermittelte Immunantworten auslösten. Diese Studie wurde gestoppt, als kein Schutz vor einer HIV-Infektion sowie keine Reduktion von Viruslasten beobachtet wurde [17]. Auch die heterologe Kombination aus DNA-Prime- und Adenovirus-Boost-Immunisierung, die sowohl humorale als auch zellvermittelte Immunantworten auslöste, erzielte keinen Schutz und wurde daher kürzlich gestoppt [105]. Bisher gibt es erst eine Studie, in der ein moderater Schutz erzielt werden konnte. In der Phase III Thai Studie, RV144, in der eine Protein-Prime- mit einer Canarypox-vektorbasierten-Boost-Immunisierung kombiniert wurde, wurde in Probanden mit einem geringen Risiko einer HIV-Infektion im Schutz eine Effizienz von 31,2 % erzielt [118]. All diese Studien waren jedoch für ein besseres Verständnis der Anforderungen an eine effiziente und gleichzeitig sichere anti-retrovirale Vakzine notwendig. Es stellte sich heraus, dass ein vollständiger Schutz nur durch eine Vakzine erreicht werden kann, die eine komplexe Immunantwort auslöst, an der neutralisierende Antikörper sowie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantworten beteiligt sind.

Zur weiteren und verbesserten Verwendung von adenoviralen Vektoren gegen eine HIV-Infektion wurde die Vakzinierung mit diesen Vektoren in der Friend Virus-Infektion etabliert, wobei verschiedene Methoden und Adjuvanzien zur Steigerung der Immunität herausgestellt wurden. Die bisher einzige Vakzine, die effizient gegen eine FV-Infektion schützt, ist lebend-attenuiertes F-MuLV [27], das eine komplexe Immunantwort auslöst. Besser geeignet sind

aufgrund der beschriebenen Sicherheitsrisiken replikationsdefiziente, virale Vektoren, die im Gegensatz zum attenuierten Virus sicher sind, aber dennoch im Vergleich zu Peptid- oder DNA-Impfstoffen eine hohe Effizienz aufweisen. In der FV-Infektion konnte dabei gezeigt werden, dass die heterologe Prime-Boost Immunisierung mit Ad5 Vektoren und Fiber-chimären Ad5F35 Vektoren einen deutlich besseren Erfolg erzielte als die homologe Wiederholungsimpfung mit einem Vektortyp [5]. Auch durch die Verwendung von genetischen Adjuvantien in Form von adenoviralen Vektoren, die spezifische Typ I-Interferone oder Chemokine kodierten, konnte die Effizienz der Immunisierung mit konventionellen Env- und Gag-kodierenden Vektoren verbessert werden [7, 83]. Dies zeigte sich durch reduzierte Viruslasten in koimmunisierten Mäusen sowie erhöhten CD4⁺ T-Zellantworten und neutralisierenden Antikörpertitern. Eine weitere Verbesserung von konventionellen Env- und Gag-kodierenden Vektoren stellt die Klonierung des *expression/display*-Vektors Ad.pIXgp70 dar ([6], Abbildung 10).

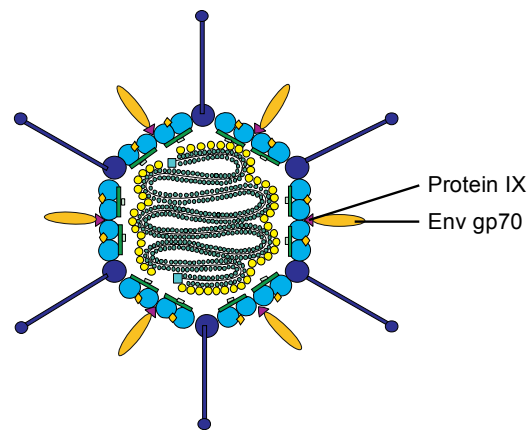


Abbildung 10: *Expression/display*-Vektor Ad.pIXgp70

Der Adenovirus-basierte *expression/display*-Vektor Ad.pIXgp70 präsentiert auf der Oberfläche das virale Oberflächenprotein gp70, was durch Fusion an das adenovirale Capsidprotein IX erfolgte [6].

Das Besondere dieses Vektors ist, dass das virale Oberflächenprotein gp70 von F-MuLV nicht nur im Vektor kodiert ist, sondern durch Fusion an das adenovirale Capsidprotein IX auch bereits in Proteinform auf der Oberfläche des Partikels präsentiert wird und direkt nach Applikation durch das Immunsystem erkannt werden kann. Immunisierungen mit diesem Vektor führten zu niedrigen Viruslasten, starken CD4⁺ T-Zellantworten und bindenden Antikörpertitern, allerdings konnten neutralisierende Antikörper erst nach Infektion mit FV detektiert werden [6]. Die bisher beschriebenen Ansätze beschränken sich zunächst auf die Induktion von CD4⁺ T-Zellantworten sowie die Antikörperbildung. Weiterhin wurden auch Möglichkeiten verfolgt, mit denen sich cytotoxische CD8⁺ T-Zellen induzieren lassen. Im Rahmen dieser Arbeit ist dabei insbesondere die Fusion des *leader*-Epitops des Friend Virus, GagL, an das immunogene Thioredoxin relevant, wodurch sich in Tierexperimenten starke cytotoxische T-Zellantworten induzieren lassen [49].

2 Zielsetzung

Bei der Entwicklung anti-retroviraler Impfstoffe ist die Induktion effektiver neutralisierender Antikörperantworten eine Herausforderung. Die Vakzinierung mit dem adenoviralen *expression/display*-Vektor Ad.pIXgp70 induzierte im FV-Modell einen guten Schutz, der sich in niedrigen Viruslasten in Plasma und Milz und in einer guten Kontrolle über die FV-induzierten Erkrankungen widerspiegelte. Vermittelt wurde der Schutz dabei durch starke CD4⁺ T-Zellantworten und bindende Antikörper, wohingegen neutralisierende Antikörper erst nach Infektion mit FV nachgewiesen werden konnten [6].

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher der durch Ad.pIXgp70 vermittelte Immunschutz weiter verbessert werden, insbesondere im Hinblick auf die Induktion neutralisierender Antikörper. Hierzu sollten verschiedene Interleukin- und Chemokin-kodierende Adenovirus-basierte Vektoren hergestellt und ihre adjuvanten Effekte im FV-Modell analysiert werden. Es sollten Interleukine und Chemokine verwendet werden, die an der Ausbildung von T_H2-Antworten beteiligt sind oder direkten Einfluss auf die B-Zellreifung oder -funktion haben. Verwendet wurden diesbezüglich adenovirale Vektoren, die die Interleukine IL4, IL5, IL6, IL7 oder IL23 sowie die Chemokine CCL1, CCL22 oder CXCL13 kodierten. Weiterhin sollten bei Beobachtung eines verbesserten Immunschutzes die entsprechenden Vektoren auch im Influenza-Modell auf ihr adjuvantes Potenzial untersucht werden.

Neben der Verwendung von Cytokin-kodierenden Vektoren sollte herausgefunden werden, ob der Impfschutz durch ein adenoviral kodiertes Thioredoxin-gp70-Fusionsprotein verbessert werden kann. Auch dabei sollte analysiert werden, ob durch die Kopplung von gp70 an das hoch-immunogene Thioredoxin im Vergleich zu Ad.pIXgp70 die Induktion von neutralisierenden Antikörperantworten verstärkt wird.

Zusätzlich zur Entwicklung einer effizienten prophylaktischen anti-retroviralen Vakzine ist auch die Entwicklung einer therapeutischen Vakzine zur Senkung der Viruslast in chronisch infizierten Patienten von großer Bedeutung. Daher sollten in dieser Arbeit rekombinante Adenoviren auch als therapeutische Vakzine im FV-Modell eingesetzt werden. Hierzu sollten zum einen Vektorkombinationen verwendet werden, die in prophylaktischen Impfstudien einen sehr guten Schutz vermittelten. Zum anderen sollte der Impferfolg durch Verwendung des Vektors Ad5.TxnGagL, der ein Fusionsprotein aus Thioredoxin und dem *leader* Gag-Epitop des Friend Virus kodiert und starke CD8⁺ T-Zellantworten in prophylaktischen Immunisierungen induzierte [49], untersucht werden und die Impfeffizienz dieses Vektors durch vorherige Modulation des Immunsystems durch verschiedene Cytokin-kodierende Vektoren weiter verbessert werden.

3 Material

3.1 Geräte

BioPhotometer plus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Brutschränke und Inkubatoren:		
CO ₂ Inkubator Modell 371	Thermo Scientific	Braunschweig, Deutschland
HERACELL 240i CO ₂ Incubator	Thermo Scientific	Braunschweig, Deutschland
Heraeus Inkubator Typ B6	Thermo Scientific	Braunschweig, Deutschland
Inkubationsschüttler MaxQ 6000	Thermo Scientific	Braunschweig, Deutschland
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD biosciences	Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometer FACS LSR II	BD biosciences	Heidelberg, Deutschland
Eismaschine MF 30	Scotsman	Mailand, Italien
Elektrophoresesystem 40-1214	PEQLAB Biotechnologie	Erlangen, Deutschland
Expert Plus		
Elektroporator GenePulser Xcell™	BIO-RAD	München, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr	Biberach, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Sanyo	München, Deutschland
Geldokumentationskammer Gene Genius	Syngene	Cambridge, Großbritannien
Homogenisator gentleMACS™ Dissociator	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Kleintiernarkosegerät	UNO	Zevenaar, Niederlande
Kühlschrank UK1720	Liebherr	Biberach, Deutschland
Mikroplattenlesegerät Asys Expert Plus	Biochrom	Berlin, Deutschland
Pipetten	Starlab	Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, Deutschland
Rotor-Gene RG-3000	Corbett	Hilden, Deutschland
	lifescience/Qiagen	
Spannungsquelle Standard Power Pack P25	Biometra	Göttingen, Deutschland
ThermalCycler C1000	BIO-RAD	München, Deutschland
Thermoschüttler MHR11	HLC BioTech	Bovenden, Deutschland
Vortex	IKA	Staufen, Deutschland

Waagen:

Präzisionswaage 440-47N	Kern	Balingen-Frommern, Deutschland
Waage Portable Scout II Balance	OHAUS	Nänikon, Schweiz
Waage SPU-402 440-47N	OHAUS	Nänikon, Schweiz
Wasserbad	GFL	Burgwedel, Deutschland
Wasserbad ED (v.2)	Julabo	Seelbach, Deutschland
Zellometer Auto T4	Nexcelom Bioscience LLC	Lawrence, MA, USA

Zentrifugen:

Zentrifuge 5424	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5430 R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge 4+16 K	Sigma Laborzentrifugen GmbH	Osterode am Harz, Deutschland

3.2 Verbrauchsmaterialien

6-, 24-, 96-Loch-Platten	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
96-Loch MaxiSorp® Platten	Nunc	Roskilde, Dänemark
Bakterienröhrchen 13 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Cell Strainer	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Combi Tips	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Filterspitzen	Starlab	Hamburg, Deutschland
Gene Pulser® Cuvette 0,2 cm	BIO-RAD	München, Deutschland
Kanüle I.V. Catheter	Jelco	Ashfort, Kent, Großbritannien
Kanülen BD Microlance™ 3	BD biosciences	Heidelberg, Deutschland
Kapillaren minicaps, NA-HEP.	Hirschmann® Laborgeräte	Eberstadt, Deutschland
MicroAmp® Fast Optical 48- well Reaction Plate	Life technologies	Darmstadt, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Whatman	Maidstone, Großbritannien
Protran		
Petrischalen	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Petrischalenspatel	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 5ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Peqlab	Erlangen, Deutschland
MultiFlexRound Tips		

Reaktionsgefäß (0,2 ml)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Spritzen BD Micro-Fine™ (0,3 ml, 0,5 ml)	BD	Heidelberg, Deutschland
Spritzen ohne Nadel (1 ml, 2 ml, 10 ml)	TERUMO	Eschborn, Deutschland
UV Film Kodak BioMax Light Film	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Whatmanpapier	Whatman	Maidstone, Großbritannien
Zellkulturflasche (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflasche (300 cm ²)	TPP	Trasadingen, Schweiz
Zellometer Zählkammer	Nexcelom Bioscience LLC	Lawrence, MA, USA

3.3 Reagenzsysteme

BD OptEIA™ Mouse IL-4 ELISA set	BD biosciences	Heidelberg, Deutschland
Chemiluminescence Detection Kit	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
CXCL13 (Mouse) ELISA Kit	Abnova GmbH	Heidelberg, Deutschland
Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit	BD biosciences	Heidelberg, Deutschland
ELISA Kit für Chemokine C-C Motif Ligand 1 (CCL1)	Uscnk Life Science Inc.	Wuhan, China
Foxp3 Fixation/Permeabilization	eBioscience	Frankfurt, Deutschland
Jetsorb Gel Extraktion Kit	Genomed	Löhne, Deutschland
Mouse ELISA Ready-SET- Go!® (IL-5, IL-6, IL-23)	eBioscience	Frankfurt, Deutschland
Mouse IL-7 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems GmbH	Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Mouse MDC enzymeimmunoassay Kit (CCL22)	Boster immunoleader	Fremont, CA, USA
NucleoBond PC 500	Macherey-Nagel	Düren, Deutschland

NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
pGEM-T Easy Vector System	Promega	Mannheim, Deutschland
PureLink™ RNA Micro Kit	Life technologies	Darmstadt, Deutschland
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
QuantiTect Probe RT-PCR Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
The Original TA Cloning® Kit	Life technologies	Darmstadt, Deutschland
pCR®2.1 vector		
TMB+ Substrat	Dako	Hamburg, Deutschland
TOPO TA Cloning® Kit pCR4®-	Life technologies	Darmstadt, Deutschland
TOPO® vector TA-Cloning Kit		
Vivapure® AdenoPACK™ 20	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland

3.4 Standards

GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
Precision Plus Protein™ Standards Dual Color	BIO-RAD	München, Deutschland

3.5 Chemikalien

ACK Lysepuffer	PAA	Pasching, Österreich
Acrylamid	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
3-Amino 4-Ethylencarbazol (AEC)	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Agarose	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ammoniumchlorid	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA	Pasching, Österreich
Brefeldin A (BFA)	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Calciumchlorid	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Dextrose-H ₂ O	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Dimethylformamid (DMFA)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth	Karlsruhe, Deutschland

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Ethanol p.a.	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Ethanol, vergällt 96 %	Alfred Quadflieg	Gelsenkirchen, Deutschland
Ethidiumbromid	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure (EGTA)	Serva	Heidelberg, Deutschland
Fc-Block	eBiosciences	Frankfurt, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Glucose	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Glycerin	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Merck	Darmstadt, Deutschland
Glycin	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
HBSS	Life technologies	Darmstadt, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Hexadimethrinbromid (Polybren)	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Isofluran	Abbott	Wiesbaden, Deutschland
Kaliumchlorid	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Kristallviolett	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
LB-Agar	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Lipofectamine® 2 000	Life technologies	Darmstadt, Deutschland
Magermilch	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Meerschweinchen Komplementserum	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Methanol	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat	AppliChem	Darmstadt, Deutschland

Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Natriumfluorid	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Nonidet P40	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Phenolrot	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Pyronin Y	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Saponin	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Schwefelsäure	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (Temed)	GE-Healthcare	München, Deutschland
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Tris-Base	AppliChem	Darmstadt, München
Tris-EDTA-Puffer (TE)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA	PAA	Pasching, Österreich
Tween20	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Wasser	Braun	Melsungen, Deutschland
Wasserstoffperoxid	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	AppliChem	Darmstadt, Deutschland

3.6 Puffer und Lösungen

ACK-Lysepuffer	8,28 g/l Ammoniumchlorid 1 g/l Kaliumhydrogencarbonat 0,1 mM EDTA
AEC-Gebrauchslösung	13 ml H ₂ O 0,325 ml Natriumacetat 0,624 ml AEC-Stammlösung 7 µl Wasserstoffperoxid
AEC-Stammlösung	4 mg/ml AEC in DMFA
Blocklösung	0,05 % (w/v) Magermilch in PBS + 0,1 % Tween-20

Boehringer Lysepuffer	5 mM EDTA 5mM EGTA 150 mM Natriumchlorid 0,1 % (w/v) Natriumdeoxycholat 40 mM Natriumfluorid 1 % (v/v) Nonidet P40 0,1 % SDS 50 mM Tris-HCl pH 7,4
Coatingpuffer	200 mM Natriumcarbonat pH 9,6
DNA-Ladungspuffer	1 Spatelspitze Bromphenolblau 30 % Glycerin in 1x TE
FACS-Puffer	0,1 % BSA 0,02 % Natriumchlorid in PBS
HBS-Puffer (2x)	10 mM Calciumchlorid 12 mM Dextrose-H ₂ O 1,5 mM Di-Natriumhydrogenphosphat 50 mM HEPES 280 mM Natriumchlorid pH 7,05
Kristallviolett-Färbelösung	40 ml Kistallviolett-Lösung (Stock) 80 ml Methanol Ad 300 ml H ₂ O
Kristallviolett-Lösung (Stock)	1 % Kristallviolett 20 % (v/v) Ethanol
Laemmlipuffer	40 % (v/v) Glycerin 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,04 % Pyronin Y 12 % (w/v) SDS 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
Laufpuffer (10x)	1,9 M Glycin 0,25 M Tris

Laufpuffer (1x)	10 % 10x Laufpuffer
	0,1 % SDS
OD-Lysepuffer pH 7,4	1 mM EDTA
	0,1 % SDS
	10 mM Tris-HCl
PBBS	0,14 g/l Calciumchlorid
	1,0 g/l Glucose
	0,32 g/l Kaliumchlorid
	0,2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat
	1,15 g/l Di-Natriumhydrogenphosphat
	7,2 g/l Magnesiumchlorid-Hexahydrat
	0,2 g/l Magnesiumsulfat-Heptahydrat
	1 % Phenolrot
PBS/BSA/Azid	1 mM Natriumazid
	5 g/l BSA
Permeabilisierungspuffer	0,5 % Saponin in PBS/BSA/Azid
Transferpuffer	20 % Ethanol, vergällt 96 %
	10 % 10x Laufpuffer
	0,05 % SDS
Waschpuffer (ELISA)	0,5 % Tween20 in PBS
Waschpuffer (Western Blot)	0,1 % Tween20 in PBS

3.7 Medien

Advanced DMEM	Life technologies	Darmstadt, Deutschland
DMSO-haltiges	40 % FCS	
Einfriermedium	20 % DMSO	
	40 % RPMI 1640	
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Life technologies	Darmstadt, Deutschland
Infektionsmedium	0,14 % BSA (steril)	
	1 % Penicillin/Streptomycin	
	in DMEM	
LB-Medium	Roth	Karlsruhe, Deutschland

R10-Medium	10 % FCS 2 mM L-Glutamine 10 mM HEPES 0,1 % β -Mercaptoethanol (50 μ M) 1 % Penicillin/ Streptomycin in RPMI1640-Medium	
RPMI 1640	Life technologies	Darmstadt, Deutschland
SOC-Medium	Life technologies	Darmstadt, Deutschland

3.8 Enzyme

Phusion® Hot Start Flex DNA Polymerase	New England Biolabs	Frankfurt a.M., Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs	Frankfurt a.M., Deutschland
T4 DNA Ligase	New England Biolabs	Frankfurt a.M., Deutschland
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland

3.9 Plasmide

pAdEasy-1	Rekombinationsplasmid mit Genom des Adenovirus Typ 5 mit Deletionen der Regionen E1 und E3; rekombinante Adenoviren werden erhalten durch homologe Rekombinationen mit pShuttle [59]	
pAdEasyF35	Rekombinationsplasmid wie pAdEasy-1, allerdings mit Kopf- und Schaft-Domänen des Fiberproteins von Adenovirus Typ 35 [106]	
pBelTxnGageOLLAS	Bluescript-basierter Vektor, der TxnGagL mit OLLAS-tag kodiert	
pGemgp70	Topovektor, der das virale gp70 kodiert	
pMA-T 12AA4MEP CXCL13	Enthält die cDNA des murinen CXCL13 (GeneArt, Regensburg, Deutschland)	
pMA-T 12AA4MFP CCL22	Enthält die cDNA des murinen CCL22 (GeneArt, Regensburg, Deutschland)	
pMA-T 12AA4MIP CCL1	Enthält die cDNA des murinen CCL1 (GeneArt, Regensburg, Deutschland)	
pShuttle-CMV	Klonierungsvektor zur Herstellung rekombinanter Adenoviren im AdEasy-System, Transgen unter Kontrolle eines CMV-Promotors [59]	

pShuttlesecTxnGagLOLLAS	pShuttle, der TxnGagL mit OLLAS-tag und vorangesetztem Sezernierungssignal kodiert
pShuttleΔpIXCMV-pA	pShuttle ohne pIX-Region (Deletion des Bereichs 938 - 1106 bp)
pUMVC3-mIL12	Enthält die cDNA des murinen IL12 (erhalten von A. Rakhmievich, University of Wisconsin-Madison, WI, USA)

3.10 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) erhalten.

CITES p40 EcoRV as	gtcagatatcctagatcggaccctgcag
CITES p40 NotI s	gtcagcggccgcccctgagatcgaattccgc
IL-23 BglII s	gtcaagatctggaacaagatgctggattgc
IL-23 NotI as	gtcagcggccgcccattcctaagctgttggcactaag
IL-4 KpnI s	ggtaccacagagctattgatgggtctc
IL-4 XhoI as	ctcgaggcatggtggctcagtactacg
IL-5 KpnI s	ggtaccacagatcatgagaaggatgcttc
IL-5 XhoI as	ctcgagctcagcctcagccttccattg
IL-6 KpnI s	ggtaccgaaaccgctatgaagttcctctc
IL-6 XhoI as	ctcgaggcataacgcactagggttgc
IL-7 BglII s	gtcaagatctgcagaccatgttccatgtttc
IL-7 XhoI as	ctcgagcatgtcctgtttatatactgccttc
M253R	agggcattttggacaaag/tcgtcta [41]
M52C	cttctaaccgaggtcgaaacg [41]
F-MuLV env sense	aagtctcccccgctcta [131]
F-MuLV env antisense	agtgcttggttaagctccctgt [131]
F-MuLV env-spezifische Sonde	(6FAM)actccacattgatttccccgtcc(TAMRA) [131]

3.11 Peptide

FV CD4	EPLTSLTPRCNTAWNRLKL (F-MuLV Env fn20 Peptid) [127]	PANATecs, Tübingen, Deutschland
FV GagL CD8	AbuAbuLAbuLTVFL (CTL-Epitop aus der leader-Region des Gag-Proteins) [126]	PANATecs, Tübingen, Deutschland
Hämagglutinin CD4	SFERFEIFPKE (von A/Puerto Rico/8/34 (H1N1))	Erhalten von Jun.-Prof. Dr. M. Tenbusch, Virologie, Bochum
Hämagglutinin CD8	IYSTVASSLV (von A/Puerto Rico/8/34 (H1N1))	Erhalten von Jun.-Prof. Dr. M. Tenbusch, Virologie, Bochum

3.12 Antikörper und Tetramere

AK 48	Aufgereinigter Antikörper der Hybridomazelllinie H48	
AK 720	Aufgereinigter Antikörper der Hybridomazelllinie H720	
Anti-Maus CD28 (Klon: 37.51)	eBioscience	Frankfurt, Deutschland
Anti-Maus CD3e (Klon: 145-2C11)	eBioscience	Frankfurt, Deutschland
anti-Maus IgG1 HRP	BD biosciences	Heidelberg, Deutschland
Esel anti-Maus HRP	Dianova	Hamburg, Deutschland
PE-MHCI H-2Cb mit FV GagL	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
CD8 Peptid	MBL	Woburn, MA, USA
PE-MHCII I-Ab oder APC-MHCII mit FV CD4 Peptid	NIH Tetramer Core Facility	Atlanta, GA, USA
Ziege anti-Maus HRP	Dako	Hamburg, Deutschland
Ziege anti-Maus IgG2a HRP	Bethyl	Montgomery, TX, USA

3.13 Fluoreszenzmarkierte Antikörper

Alle Fluoreszenzmarkierten Antikörper wurden von eBioscience (Frankfurt, Deutschland) oder BD bioscience (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

Alexa Fluor 700 (AF700)- α -CD4, AF700- α -CD44

Allophycocyanin (APC)- α -GzmB, APC- α -IL4, APC- α -TNFR1I, APC- α -IL2

eFluor 450 (eF450)- α -CD8, eF450- α -IL2

eFluor 605 (eF605)- α -CD4

eFluor 710 (eF710)- α -CD4

eFluor780 (eF780)-Fixable Viability Dye (messbar im APC-Cy7-Kanal)

Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)- α -CD11b, FITC- α -PD1, FITC- α -IFN γ , FITC- α -Foxp3

PacificBlue- α -Helios (messbar im eF450-Kanal)

Peridin-Chlorophyll-Proteinkomplex (PerCP)- α -CD43, PerCP- α -CD103

Phycoerythrin (PE)- α -IL6, PE- α -V β 5, PE- α -IFN γ

Phycoerythrin-Cyanin7 (PE-Cy7)- α -CD62L, PE-Cy7- α -TNF α , PE-Cy7- α -CD25

3.14 Antibiotika

Carbenicillin	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ciprofloxacin	Fresenius Kabi	Bad Homburg, Deutschland
Kanamycin	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Monensin	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA	Pasching, Österreich

3.15 Zelllinien

H48	Hybridoma-Zelllinie; produziert einen neutralisierenden Antikörper gegen F-MuLV Env
H720	Hybridoma-Zelllinie; produziert einen Antikörper gegen F-MuLV Env
HEK 293A (ATCC® CRL-1573™)	Humane embryonale Nierenepithelzellen, die die Ad5 E1-Genregion exprimieren (Invitrogen, Carlsbad, Deutschland)
HEK 293T (ATCC® CRL-3216™)	Humane embryonale Nierenepithelzellen, die die Ad5 E1-Genregion und das große T-Antigen des Simian Virus 40 exprimieren
HEK 293A.pIXgp70	HEK 293A-Zellen, die durch Transfektion mit einem pIX-gp70 pcDNA Vektor transfiziert und durch Neomycin selektiert wurden [6]
MDCK-II	Nierenepithelzellen des Hundes (erhalten von Dr. C. Ehrhardt, Virologie, Münster)
Mus dunni (ATCC® CRL-2017™)	Murine Fibroblastenzelllinie [80]

3.16 Bakterien

5-alpha Competent E.coli	New England Biolabs	Frankfurt a.M., Deutschland
E. coli BJ5183	Life technologies	Darmstadt, Deutschland

3.17 Viren

Ad5.CCL3	Rekombinantes Ad5, das das murine CCL3 kodiert (erhalten von Dr. W. Bayer)
Ad5.env	Rekombinantes Ad5, das das Oberflächenprotein Env von FV kodiert (erhalten von Dr. W. Bayer)
Ad5.HA	Rekombinantes Ad5, das das Hämagglutinin H1 von Influenza A kodiert (erhalten von Jun.-Prof. Dr. M. Tenbusch)
Ad5.IFN γ	Rekombinantes Ad5, das das murine IFN γ kodiert (erhalten von Dr. W. Bayer)
Ad5.IFN α 4	Rekombinantes Ad5, das das murine IFN α 4 kodiert (erhalten von Dr. W. Bayer)
Ad5.pIXgp70	Rekombinantes Ad5, das das virale Oberflächenprotein gp70 kodiert und durch Fusion an das adenovirale Capsidprotein pIX auf der Partikeloberfläche trägt [6] (erhalten von Dr. W. Bayer)

Ad5.TxnGagL	Rekombinantes Ad5, das das FV <i>leader</i> -Epitop von Gag fusioniert an Thioredoxin kodiert [49] (erhalten von Dr. W. Bayer)
Ad5F35.pIXgp70	Fiber-chimäres Ad5F35, das das virale Oberflächenprotein gp70 kodiert und durch Fusion an das adenovirale Capsidprotein pIX auf der Partikeloberfläche trägt (erhalten von Dr. W. Bayer)
F-MuLV	Aufgereinigter F-MuLV-Helfervirus
F-MuLV-N	N-tropes F-MuLV [19], 24 h-Überstand von <i>Mus dunni</i> -Zellen
FV	10 %iges (w/v) Homogenat von Milzen 14 Tage infizierter Balb/c Mäuse
Influenzavirus	Influenza A/PR/8/34 (H1N1)

3.18 Versuchstiere

Balb/c	Élevage Janvier	Le Genest-Staint-Isle, Frankreich
C57BL/6	Harlan Laboratories	Rossdorf, Deutschland
CB6F1	Charles River Laboratories	Sulzfeld, Deutschland
	Harlan Laboratories	Rossdorf, Deutschland

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

4.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Amplifikationen von DNA-Fragmenten erfolgten mit dem Phusion®Hot Start Flex DNA Polymerase-Kit nach Herstellerangaben.

Standardmäßig wurden dabei folgende Temperaturzyklen verwendet:

1. Denaturierung: 98 °C, 5 min
2. Denaturierung: 98 °C, 30 sec
3. Annealing: 62 °C, 30 sec
4. Elongation: 72 °C, 30 sec
10 Wiederholungen ab Schritt 2 mit Reduzierung der Annealing-Temperatur um 1 °C je Zyklus
5. Denaturierung: 98 °C, 30 sec
6. Annealing: 52 °C, 30 sec
7. Elongation: 72 °C, 30 sec
30 Wiederholungen ab Schritt 5
8. Elongation: 72 °C 10 min

In Abhängigkeit von der Fragmentgröße wurde die Elongationszeit auf 30 s/kb verlängert.

4.1.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Durch horizontale Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente in Agarosegelen nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierzu wurden 1 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst, mit 0,01 % Ethidiumbromid-Lösung versetzt und in einer Gelkammer ausgehärtet. DNA-Proben wurden 1 : 6 mit DNA-Ladungspuffer versetzt und in die Taschen des ausgehärteten und mit TAE-Puffer überschichteten Gels aufgetragen. Als Größenstandards dienten 10 µl einer DNA 1 kb bzw. 100 bp-Leiter. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch Anlegen einer Spannung von etwa 140 V für ca. 45 min.

4.1.3 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das gewünschte Gelstück wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde daraus mithilfe des Jetsoorb Gel Extraktion Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt.

4.1.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Generierung neuer Plasmide wurden Ligationen mit der T4-DNA-Ligase durchgeführt. Standardmäßig wurden hierzu 1 µl Backbone-DNA, 5 µl Insert-DNA, 2 µl Ligase-Puffer, 1 µl T4-Ligase und 11 µl Wasser zusammengefügt und für 1 - 2 h bei RT inkubiert.

4.1.5 TA-Klonierung

4.1.5.1 Anhängen eines Adenosin-Überhangs

Für die Umsetzung eines PCR-Produkts in den pCR2.1 TA-Vektor, der überhängende Tyrosinreste enthält, musste das PCR-Fragment zunächst mit einem überhängenden Adenosinrest versehen werden. Hierzu wurde das PCR-Fragment mit einer *Taq* DNA Polymerase und 10 mM ATP für 15 min bei 72 °C inkubiert.

4.1.5.2 TA-Klonierung

Die TA-Klonierung erfolgte mit dem pCR2.1 TA- oder pCR4blunt TA-Cloning Kits nach Herstellerangaben.

4.1.6 Transformation von Bakterien

4.1.6.1 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Für die Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente Bakterien wurden 15 µl NEB 5-alpha Competent *E. coli* mit 3 µl Ligationsansatz versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte mittels Hitzeschock bei 42,2 °C für 35 sec, 250 µl SOC-Medium wurden hinzugefügt und die Bakterien für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.1.6.2 Herstellung elektrokompenter Bakterien

Eine 300 ml-Kultur wurde mit Bakterien einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{600 nm} von ~0,8 bei 32 °C geschüttelt. Nach einer Inkubation von 10 - 60 min auf Eis wurden die Bakterien für 10 min bei 2 600 g und 4 °C pelletiert, zweimal mit dem selben Volumen eiskaltem Wasser versetzt mit 15 % (v/v) Glycerol gewaschen und für 30 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 20 ml Restvolumen resuspendiert, erneut für 10 min pelletiert und in 5 ml Restvolumen resuspendiert. Abschließend wurden die Zellen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

4.1.6.3 Transformation elektrokompenter Bakterien

50 µl elektrokompenter Bakterien wurden auf Eis mit 3 µl gefällter Plasmid-DNA gemischt und in eine 0,2 cm-Küvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV. Nach der Zugabe von 200 µl SOC-Medium wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten ausplattiert.

4.1.7 Plasmidisolation in analytischem Maßstab (Mini-Prep)

Nach der Überimpfung einer einzelnen Bakterienkolonie von einer LB-Agar-Platte in etwa 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum und Inkubation über Nacht bei 32 °C erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA mit dem NucleoSpin Plasmid-Kit nach Herstellerangaben.

4.1.8 Plasmidisolation in präparativem Maßstab (Maxi-Prep)

Für die Plasmidaufreinigung in größerem Maßstab wurden 250 ml LB-Medium mit einer 3 ml Bakterienkultur im Verhältnis ~1 : 1 000 angeimpft und über Nacht bei 32 °C angezogen. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte anschließend mithilfe des NucleoBond PC 500-Kits nach Herstellerangaben.

4.1.9 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Zur spezifischen Spaltung von Plasmid-DNA wurde die gewünschte Plasmidmenge mit 1 µl Restriktionsenzym und 1x Restriktionspuffer nach Herstellerangaben versetzt und für 2 - 3 h bzw. über Nacht bei 37 °C inkubiert. Standardmäßig wurden zur Kontrolle von Mini-Preps 20 µl aufgereinigtes Plasmid, von einer Maxi-Prep 3 µg Plasmid-DNA in einen 50 µl Restriktionsansatz eingesetzt.

4.1.10 Fällung von geschnittener Plasmid-DNA

Für die Fällung der Plasmid-DNA eines 50 µl Restriktionsansatzes wurden 5 µl 3 M Natriumacetat und 165 µl kaltes Ethanol hinzugefügt und für 30 min bei 14 000 g und 4 °C pelletiert. Nach erneutem Waschen mit 200 µl kaltem Ethanol und Zentrifugation für 5 min wurde das Pellet an der Luft getrocknet und anschließend in Wasser aufgenommen.

4.1.11 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Zur Konzentrationsbestimmung einer DNA-Lösung wurde deren Absorption bei 260 nm gemessen und die Konzentration nach folgender Gleichung bestimmt:

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg/ml doppelsträngige DNA}$$

4.1.12 Sequenzierung

DNA Sequenzierungen führte die Firma LGC Genomics (Berlin, Deutschland) durch.

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Expressionskontrolle der Interleukinvektoren wurden die jeweiligen Interleukine mittels ELISA aus Zellkulturüberständen transfizierter Zellen nachgewiesen. Hierfür wurden die Kits BD

OptEIA™ Mouse IL-4 ELISA Set, mouse ELISA Ready-SET-Go!® für IL-5, IL-6 und IL-23 und mouse IL-7 Quantikine ELISA Kit nach Herstellerangaben verwendet.

Zur Kontrolle der Chemokinexpression wurden die ELISA Kits für Chemokine C-C Motif Ligand 1 (CCL1), das CXCL13 (Mouse) ELISA Kit sowie das Mouse MDC enzymeimmunoassay Kit (CCL22) nach Herstellerangaben verwendet.

4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli werden denaturierte Proteine nach ihrer Größe im elektrischen Feld aufgetrennt. Zur Herstellung der Zelllysate wurde das Medium der transfizierten Zellen entfernt und die Zellen mit 100 µl Boehringer Lysepuffer je Vertiefung einer 6-Loch-Platte für 15 min inkubiert. Das Lysat wurde anschließend abgenommen und bei -20 °C gelagert.

Standardmäßig wurden 15 µl Lysat mit 5 µl 4x Laemmli-puffer versetzt und 15 min bei 95 °C denaturiert. Als Standard dienten 8 µl Precision Plus Protein™ Standards Dual Color. Die Auftrennung erfolgte in einem 10 %igen Gel bei einer konstanten Spannung von 150 V für etwa 1,5 h, bis die Lauffront aus dem Gel ausgetreten war.

4.2.3 Western Blot

Der Transfer der während der SDS-PAGE im Acrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte bei einer Spannung von 100 V für 1 h.

Um bestimmte Proteine auf der Nitrozellulosemembran immunologisch nachzuweisen, wurde die Membran zunächst für 30 min in Blocklösung bei RT inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS-T (0,1 % Tween-20) für jeweils 5 min wurde der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper für 1 h bei RT zur Membran gegeben. Nach erneutem Waschen erfolgte die Detektion mit dem Chemiluminescence Detection Kit. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mithilfe eines Röntgenfilms.

4.3 Zytologische Methoden

4.3.1 Kultivierung von Zellen

Je nach Flaschengröße wurden die verwendeten Zelllinien mit 5 ml, 15 ml, 30 ml oder 50 ml des entsprechenden Mediums bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Die Passagierung der Zellen erfolgte jeweils nach 3 - 4 Tagen. Die Zellen wurden zunächst mit 1x PBS gewaschen, anschließend mit 1x Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert und in Medium resuspendiert. Die gewünschte Zellmenge wurde in eine neue Zellkulturflasche mit entsprechendem Medium gegeben.

4.3.2 Zellen einfrieren und auftauen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese zunächst mit Trypsin/EDTA-Lösung versetzt, durch Zugabe von Medium resuspendiert und anschließend für 10 min bei 1 000 g und 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde in 10 % DMSO-haltigem Einfriermedium aufgenommen, aliquotiert und bei -193 °C gelagert.

Zur Kultivierung eingefrorener Zellen wurden diese aufgetaut, in 20 ml frischem Medium gewaschen, um überschüssiges DMSO zu entfernen, und anschließend wie beschrieben kultiviert.

4.3.3 DNA-Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Methode

Bei Transfektionen mittels Calcium-Phosphat [53] wurden Zellen mit einer Konfluenz von ~70 % verwendet. Für 25 cm² Zellkulturflaschen wurden standardmäßig 10 - 15 µg gefällte Plasmid-DNA in 219 µl Wasser gelöst und mit 31 µl 2 M Calciumchlorid versetzt. Nach gutem Vermischen wurden tropfenweise 250 µl 2x HBS hinzugefügt und 10 min bei RT inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde auf die ausplattierten Zellen gegeben und das Medium anschließend nach 4 - 6 h gewechselt.

4.3.4 DNA-Transfektion mittels Polyethylenimin (PEI)

Bei Transfektionen mittels Polyethylenimin wurden Zellen mit einer Konfluenz von ~90 % verwendet. Für 25 cm² Zellkulturflaschen wurden ebenfalls 10 - 15 µg gefällte Plasmid-DNA verwendet und in 10 µl Wasser gelöst. Die DNA wurde mit 500 µl serumfreiem DMEM-Medium gemischt und mit 15 µl PEI versetzt und nach gründlichem Mischen für 10 min bei RT inkubiert. Das Medium der kultivierten Zellen wurde auf ein Medium mit einem FCS-Gehalt von 1,5 % (v/v) gewechselt, bevor der Transfektionsansatz hinzugegeben wurde. Um überschüssigen Transfektionsansatz aus dem Medium zu entfernen, wurde das Kulturmedium nach 4 - 6 h gewechselt.

4.3.5 DNA-Transfektion mittels Lipofektamin

Die Transfektion von Zellen mittels Lipofektamin erfolgte mit Lipofectamine 2 000 nach Herstellerangaben.

4.3.6 Virusanzucht

Für die Anzucht von adenoviralen Vektoren wurden zunächst HEK 293-Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen durch eine der beschriebenen Methoden transfiziert. Nach vollständigem zytopathischen Effekt wurde der Überstand in ein 15 ml oder 50 ml Reaktionsgefäß überführt und 3 mal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut, um noch intakte Zellen zu zerstören, sodass das enthaltene Virus freigesetzt wird. Anschließend wurden die Zelltrümmer

bei 3 500 g für 10 min pelletiert und der Überstand auf frische Zellen in einer nächstgrößeren Zellkulturflasche gegeben. Dies erfolgte bis zu einer Expansion auf 2x 300 cm² oder 4x 175 cm² Zellkulturflaschen.

4.3.7 Aufreinigung von adenoviralen Vektoren

Für die Aufreinigung von adenoviralen Vektoren aus Zellkulturüberständen wurde das Vivapure® AdenoPACK™ 20 nach Herstellerangaben verwendet.

4.3.8 Titerbestimmung

4.3.8.1 TCID₅₀

Durch Infektion von Zellen in einer 96-Loch-Platte mit verschiedenen Virusverdünnungen erfolgte die Titerbestimmung nach der TCID₅₀-Methode. In den ersten Vertiefungen wurden 118,8 µl Medium vorgelegt und mit 1,2 µl des Virusstocks gemischt. Je 12 µl dieser Verdünnung wurden in die folgende Vertiefung mit 108 µl Medium überführt und sukzessiv weiter verdünnt. Es wurden 100 µl der Virusverdünnungen auf eine 96-Loch-Platte überführt, in der am Vortrag $1 \cdot 10^4$ HEK 293-Zellen in 100 µl pro Vertiefung ausplattiert worden waren. Nach 3 - 7 Tagen wurde der zytopathische Effekt beurteilt. Aus den Vertiefungen, in denen ein zytopathischer Effekt zu erkennen war, wurde ein Quotient für jede Verdünnung ermittelt und die TCID₅₀ nach der folgenden Formel berechnet:

$$T = 10^{1+d(S-0,5)} \quad \text{mit} \quad d = \log_{10} \text{ der Verdünnung} \\ S = \text{Summe der Quotienten}$$

Das Ergebnis entspricht dem Titer des Virusstocks in TCID₅₀ für das eingesetzte Volumen.

4.3.8.2 Titerbestimmung mittels optischer Dichte

8 µl des Virusstocks wurden in 72 µl OD-Lysepuffer verdünnt und 20 min bei 56 °C unter Schütteln inkubiert. Die optische Dichte bei 260 nm wurde bestimmt und die optischen Partikeleinheiten nach folgender Formel berechnet:

$$\text{virale Partikel/ml} = OD_{260 \text{ nm}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 1,1 \cdot 10^{12}$$

4.4 Immunologische Methoden

4.4.1 Vakzinierung

Die prophylaktischen Vakzinierungen im FV-Modell erfolgten nach einem heterologen Prime-Boost-Schema im Abstand von 4 Wochen. Dabei erhielten die Mäuse bei der Erstimmunisierung Ad5-basierende Vektoren, bei der zweiten Impfung wurden fiberchimäre Ad5F35 Vektoren verwendet. Als Immunisierungsdosis wurden von jedem Vektor $1 \cdot 10^9$ vp/ml verwendet. Die Applikation erfolgte entweder in die Plantarseite beider Hinterpfoten (jeweils 50 µl) oder

intramuskulär in die *M. gastrocnemius* (jeweils 30 µl). Die prophylaktischen Immunisierungen gegen Influenza sowie therapeutische Vakzinierungen im FV-Modell erfolgten lediglich mit Ad5 Vektoren und wurden stets intramuskulär in den *M. gastrocnemius* appliziert.

4.4.2 Infektion

Drei Wochen nach der zweiten Immunisierung erfolgte die Belastungsinfektion. Bei FV-Versuchen erhielten susceptible CB6F1-Mäuse eine Dosis von 2 500 Milz-Fokus-bildenden Einheiten (*spleen focus forming units*, SFFU) FV in 100 µl PBS intravenös. Für die Analyse von FV-spezifischen CD4⁺ T-Zellantworten erhielten CB6F1-Mäuse eine Dosis von 500 SFFU FV. Chronische Infektionen für therapeutische Vakzinierungsstudien gegen das Friend Virus wurden in resistenten C57BL/6 Mäusen durch eine Dosis von 15 000 SFFU FV erreicht. Die Influenza-Belastungsinfektion erfolgte in Balb/c Mäusen intranasal mit einer Dosis von 2 500 Plaque-bildenden Einheiten (*plaque-forming units*, PFU) in 50 µl PBS.

4.4.3 Kontrolle des Infektionsverlaufs

4.4.3.1 Palpation der Milz während der FV-Infektion

Nach der Belastungsinfektion wurde der Krankheitsverlauf zwei Mal wöchentlich durch Palpation der Milzgröße kontrolliert. Hierzu wurden die Tiere zunächst mit Isofluran narkotisiert und anschließend die Milzgröße ertastet. Die Kategorisierung erfolgte von 1 (nicht vergrößert) bis 4 (sehr stark vergrößert); für eine Milz der Kategorie 1 entsprach dies etwa einem Gewicht bis 0,5 g, Milzen mit einem Gewicht von 0,5 - 0,8 g wurden in Kategorie 2 eingeteilt. Ein Gewicht von etwa 0,8 - 1,2 g entsprach Kategorie 2,5, bei einem Gewicht von etwa 1,2 - 1,7 g erfolgte die Zuordnung in Kategorie 3 und Milzen mit einem Gewicht ab 1,7 g wurden in Kategorie 4 eingestuft.

4.4.3.2 Gewichtsverlauf während der Influenzainfektion

Der Gewichtsverlust während der Influenzainfektion wurde durch tägliches Wiegen dokumentiert. Als Ausgangsgewicht wurde der Mittelwert aus den Messungen vor und am Tag der Infektion verwendet und der Gewichtsverlust während der Infektion prozentual ermittelt.

4.4.4 Blutentnahme

Blutentnahmen erfolgten zu verschiedenen Zeitpunkten der einzelnen Versuche. Zur Antikörperbestimmung wurden nach jeweiliger Immunisierung etwa 10 Tropfen Blut entnommen und das Serum nach Zentrifugation von 10 min bei 1 000 g abgenommen und bei -20 °C gelagert. Für die Bestimmung der Plasma-Virämie während der FV-Infektion bzw. für FACS-Färbungen aus dem Blut wurden 6 - 8 Tropfen Blut entnommen und zur Vermeidung der Gerinnung mit 2,5 µl Heparin gemischt. Nach Zentrifugation wurde das Plasma abgenommen und bei -80 °C gelagert.

4.4.5 Bestimmung der Viruslast

4.4.5.1 Bestimmung der Plasma-Virämie während der FV-Infektion

Zur Bestimmung der Viruslast im Blut wurde den Mäusen 10 Tage nach der Belastungsinfektion Blut abgenommen und Plasma isoliert. Am Vortag in einer 24-Kavitäten-Platte ausplattierte *Mus dunni* Zellen (7 500 Zellen/Vertiefung) wurden mit 25 µl Polybren (80 µg/ml) versetzt und mindestens 1 h inkubiert. Währenddessen wurde das Plasma verdünnt: in die erste Vertiefungen einer 96-Loch-Platte wurden 10 µl Plasma mit 100 µl PBS verdünnt, in die weiteren Vertiefungen wurden jeweils 80 µl PBS vorgelegt. Aus der ersten Verdünnung wurde seriell mit jeweils 40 µl weiterverdünnt. Anschließend wurden 50 µl jeder Verdünnung auf die Zellen übertragen und diese etwa 3 Tage bis zur Konfluenz inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Ethanol fixiert, zweimal mit PBS + 0,1 % BSA gewaschen und mit 200 µl/Vertiefung AK720 für mindestens 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde mit jeweils 200 µl des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers Ziege- α -Maus (1 : 500 in PBS verdünnt) inkubiert. Die Detektion erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS durch Zugabe von 500 µl AEC-Gebrauchslösung. Mithilfe der Anzahl erkennbarer Foki konnte die Anzahl Fokus-bildender Einheiten (*focus-forming units*; FFU)/ml Plasma ermittelt werden.

4.4.5.2 Immunocytochemische Bestimmung der Viruslast in der Milz im *infectious center*- (IC-) Assay bei FV-Infektion

Zur Bestimmung der Viruslast in der Milz wurden die Mäuse 3 Wochen nach Belastungsinfektion durch zervikale Dislokation getötet und die Milzen entnommen. Nach dem Wiegen wurden die Milzen durch cell strainer zerrieben, um durch Zugabe von 10 ml PBBS eine Einzelzellsuspension herzustellen. Bei stark vergrößerten Milzen wurde hierzu nur ein eingewogener Teil verwendet. Die Zellkonzentration wurde mithilfe eines Zellzählers ermittelt und die Zellzahl auf $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml in RPMI-Medium eingestellt. Für die Milzzellverdünnungen wurden in einer 24-Loch-Platte zunächst 200 µl der Einzelzellverdünnung in 1,8 ml RPMI-Medium überführt und diese seriell weiter verdünnt. 1 ml jeder Verdünnung wurde auf eine 6-Loch-Platte mit *Mus dunni* Zellen, die am Vortag ausplattiert worden waren (20 000 Zellen/Vertiefung), überführt und bis zur Konfluenz unter Standardbedingungen kultiviert. Die Fixierung und Färbung der Foki erfolgte wie für den Virämie-Assay beschrieben. Verwendet wurden jeweils 700 µl der Antikörper sowie 1 - 2 ml Detektionslösung. Die Viruslast wurde anhand der Anzahl gefärbter Foki als infektiöse Zentren (IC)/Milz berechnet.

4.4.5.3 Bestimmung der Viruslast in der Milz mittels RT-qPCR bei FV-Infektion

Zur Bestimmung der Viruslast in der Milz mittels PCR wurden zunächst $2 \cdot 10^7$ Milzzellen in 200 µl Trizol bei -80 °C eingefroren. Nach Resuspension der Milzzellen erfolgte die RNA-Isolation nach Herstellerangaben mit dem TRIzol® Reagent. Anschließend wurde das Eluat zusätzlich mit dem PureLink™ RNA Micro Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Zur

Bestimmung der RNA-Kopien im Eluat wurden zunächst 10 µl des Eluats mit 2,5 µl antisense Primer für 5 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Für die RT-Reaktion wurde das QuantiTect Probe RT-PCR Kit verwendet; als Standards dienten 7 Ansätze mit einer bekannten Kopienzahl von 10^6 bis 10^0 Kopien.

- 10 µl RT-Puffer
- 1 µl Taqman-Sonde (4 pmol/µl)
- 0,2 µl Reverse Transkriptase
- 5 µl Probe bzw. Standard
- 2,8 µl RNase-freies Wasser

Die Ansätze wurden zunächst für 20 min bei 50 °C und 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde pro Ansatz 1 µl sense Primer hinzugefügt und die PCR nach folgendem Programm durchgeführt:

1. 95 °C, 15 min
 2. 96 °C, 15 sec
 3. 53 °C, 60 sec
- 45 Wiederholungen ab Schritt 2

Anschließend wurden die Viruslasten als Kopien/Milz berechnet.

4.4.5.4 Bestimmung der Viruslast in BAL und Lunge bei Influenzainfektion durch RT-qPCR

Zur Bestimmung der Viruslasten in der Bronchoalveolären Lavage (BAL) und Lunge wurden die Mäuse 6 Tage nach Belastungsinfektion durch Inhalation von Isofluran getötet. Für die BALs wurden die Lungen der Tiere mit jeweils 2 ml PBS gespült und durch Zentrifugation von Zellen getrennt. Die Lungen wurden entnommen und mithilfe des gentleMACS zerkleinert. Alle Proben wurden vor Gebrauch bei -80 °C eingefroren.

Zur Analyse wurden die Proben aufgetaut und für 5 min bei 5 000 g pelletiert. Aus dem Überstand erfolgte dann die Isolation viraler RNAs aus BAL und Lunge, die mithilfe des QIAamp Viral RNA Mini Kits nach Herstellerangaben erfolgte.

Für die Ansätze der RT-PCR wurde das QuantiTect Probe RT-PCR Kit wie folgt verwendet:

- 10 µl 2 x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix
- Je 1 µl der Primer M52C und M53R
- 1 µl Sybr green (1 : 5000 verdünnt aus Stammlösung)
- 1 µl RNA aus Hefe (1 µg/µl)
- 0,2 µl QuantiTect RT Mix
- 0,8 µl RNase freies Wasser
- 5 µl Probe bzw. Standards

Als Standards dienten 7 Ansätze mit einer Kopienzahl von 10^7 bis 10^1 Kopien in der PCR.

Die RT-PCR erfolgte nach folgendem Programm:

1. 50 °C, 20 min
2. 95 °C, 15 min
3. 95 °C, 10 sec
4. 61 °C, 60 sec
5. 72 °C, 30 sec
6. 81 °C, 15 sec

45 Wiederholungen ab Schritt 3

Zusätzlich Schmelzkurve von 50 - 99 °C

Die Viruslasten wurden als Kopien/ml bzw. Kopien/Lunge berechnet.

4.4.6 Bestimmung der humoralen Immunantwort

4.4.6.1 Bindende Antikörper mittels ELISA

Für die Bestimmung bindender Antikörper im Serum wurden zunächst 96-Loch MaxiSorp-Platten für FV mit 0,5 µg Gesamtvirusantigen, für Influenza mit $1 \cdot 10^6$ PFU/Vertiefung in 100 µl Coatingpuffer beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit jeweils 300 µl PBS + 0,5 % Tween-20 wurde mit 300 µl PBS + 10 % FCS für 30 min bei RT geblockt. Währenddessen erfolgte die Verdünnung der Serumproben in einer separaten 96-Loch-Platte: in der ersten Verdünnung wurden 135 µl, in den weiteren jeweils 120 µl PBS + 10 % FCS vorgelegt. Für die ersten Verdünnungen wurden 15 µl Serum verwendet und diese sukzessiv mit jeweils 30 µl weiterverdünnt. Nach erfolgtem Blocken wurden jeweils 100 µl der Serumverdünnungen auf die MaxiSorp-Platten übertragen und 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers: hierzu wurden jeweils 100 µl der HRP-gekoppelten Antikörper Esel anti-Maus (1 : 15 000), anti-Maus IgG1 (1 : 1 000) oder Ziege anti-Maus IgG2a (1 : 25 000) in PBS + 10 % FCS verdünnt verwendet. Nach erneuter Inkubation und fünfmaligem Waschen wurde zur Entwicklung 100 µl TMB-Plus Substrat pro Vertiefung hinzugefügt, im Dunkeln inkubiert, die Blaufärbung durch Zugabe von 100 µl 1 N Schwefelsäure abgestoppt und die Absorption bei 450 nm gemessen. Als Grenzwert, welche Verdünnungen als positiv bewertet wurden, diente das Dreifache der optischen Dichte, die beim Serum naiver Mäuse detektiert wurden.

4.4.6.2 Neutralisierende Antikörper gegen FV

In FV-Versuchen erfolgte die Detektion neutralisierender Antikörper aus dem Serum 2 Wochen nach der zweiten Immunisierung sowie 10 Tage nach Belastungsinfektion im Plasma. Hierfür wurde potenziell vorliegendes Virus aus Serum- bzw. Plasmaproben zunächst durch Inkubation für 30 min bei 56 °C inaktiviert. In einer 96-Loch-Platte wurden die Proben in den ersten

Vertiefungen 1 : 4 und weitergehend seriell 1 : 2 in PBS verdünnt. In einer weiteren 96-Loch-Platte wurden 15 µl der Plasmaverdünnung mit 15 µl einer F-MuLV-Verdünnung sowie 10 µl einer 1 : 3 Verdünnung von Meerschweinchen-Komplement gemischt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die F-MuLV-Verdünnung wurde dabei so gewählt, dass in der Negativkontrolle mit PBS in Abwesenheit von neutralisierenden Antikörpern etwa 30 - 60 Foki erhalten wurden. Als Positivkontrolle dienten 15 µl AK48. Die Ansätze wurden anschließend auf 24-Loch-Platten mit *Mus dunni* Zellen gegeben, die am Vortag ausplattiert (7 500 Zellen/Vertiefung) und eine Stunde zuvor mit 25 µl Polybren (80 µg/ml) versetzt worden waren. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz etwa 3 Tage inkubiert und anschließend fixiert und gefärbt, wie es für den Virämie-Assay beschrieben wurde. Verdünnungen, die zu einer Reduktion der Foki um mindestens 75 % führten, wurden als neutralisierend bewertet.

4.4.6.3 Neutralisierende Antikörper gegen das Influenzavirus

Neutralisierende Antikörper gegen das Influenzavirus wurden jeweils 2 Wochen nach Immunisierung untersucht. Am Vortag wurden MDCK-II Zellen mit $5 \cdot 10^4$ Zellen/Vertiefung einer 96-Loch-Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Serumproben wurden zunächst 1 : 10, dann 7 mal seriell 1 : 2 in Infektionsmedium weiterverdünnt. 50 µl der Serumverdünnungen wurden mit demselben Volumen einer Virusverdünnung (Pr8/34, $2 \cdot 10^3$ PFU/Vertiefung) versetzt und 60 min bei 37 °C inkubiert. Als Kontrollen dienten Viruslösung mit Medium als Positivkontrolle sowie Medium allein als Negativkontrolle. Anschließend wurde das Medium von den Zellen entfernt und 100 µl der inkubierten Serumverdünnungen auf die Zellen gegeben. Nach Inkubation für 1,5 h bei 37 °C wurden 150 µl Infektionsmedium zugegeben und für weitere 4 Tage inkubiert. Die Analyse von zytopathischen Effekten erfolgte optisch durch ein Lichtmikroskop sowie durch Anfärbung. Für die Färbung wurde der Überstand entfernt, 100 µl Kristallviolett-Lösung pro Vertiefung auf die Zellen gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Abschließend wurden die Platten vorsichtig mit Wasser gespült und getrocknet. Als neutralisierend wurde die Verdünnung bewertet, bei der keine Zerstörungen des Zellrasens zu beobachten waren.

4.4.6.4 neutralisierende IgG-Antikörper

Zur Bestimmung von neutralisierenden IgG-Antikörpern wurden die Serum- bzw. Plasmaproben nach Virusinaktivierung mit demselben Volumen 0,2 M β -Mercaptoethanol in PBS gemischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Verdünnungen erfolgten in 0,01 M β -Mercaptoethanol in PBS. Der weitere Ablauf erfolgte analog zu den beschriebenen Neutralisationstests (vgl. Kapitel 4.4.6.2 und 4.4.6.3).

4.4.7 Bestimmung der zellulären Immunantwort

4.4.7.1 Probenvorbereitung

Für die Färbung von Milzzellen wurden Zellen aus Einzelzellsuspensionen verwendet. Einzelzellsuspensionen aus Lymphknoten entstanden durch Zerreiben der Lymphknoten durch cell strainer und anschließender Aufnahme in 5 ml PBBS. Für die Färbung von Blutzellen mussten diese zunächst lysiert werden. Die Lyse der Blutzellen erfolgte in 5 ml ACK-Lysepuffer für 10 - 15 min bei RT. Die Lyse wurde durch die Zugabe von 10 ml PBS abgestoppt und die Zellen für 5 min bei 800 g abzentrifugiert. Nach Abschütten des Überstands wurden die Zellen im Restvolumen resuspendiert und auf 2 - 3 Färbungen aufgeteilt.

4.4.7.2 Oberflächenfärbung

Für die Anfärbung von Oberflächenmarkern wurden die gewünschten Zellen in eine 96-Loch-Platte überführt und abzentrifugiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl der in FACS-Puffer verdünnten Antikörper hinzugegeben und für 10 - 20 min bei RT im Dunklen inkubiert.

4.4.7.3 Intrazelluläre Färbung

Nach der Färbung von Oberflächenmarkern wurden die Zellen durch Zugabe von 150 µl FACS-Puffer und nochmal mit jeweils 200 µl gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit dem BD Cytotfix/Cytoperm Kit für 8 min fixiert. Die folgenden Waschschriffe erfolgten mit dem zugehörigen Permeabilisierungspuffer. Für die intrazelluläre Färbung wurden die gewünschten Antikörper im Permeabilisierungspuffer verdünnt und erneut 50 µl des Antikörpermix pro Probe verwendet. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei RT im Dunklen. Anschließend konnten die Proben nach erneutem Waschen und Aufnahme in FACS-Puffer durchflusszytometrisch untersucht werden.

Für die Anfärbung des Transkriptionsmarkers Foxp3 erfolgte die Fixierung nach der Oberflächenfärbung mit dem Foxp3 Fixation/Permeabilisation Kit für 2 - 3 h bei 4 °C. Anschließend erfolgte die Färbung im Permeabilisierungspuffer für 30 min bei RT.

4.4.7.4 Tetramerfärbung

In FV-Experimenten wurden virusspezifische T-Zellen mithilfe der Tetramertechnologie untersucht. Dabei sind MHC-Protein-Komplexe an Fluorochrom-gekoppeltes Streptavidin gebunden, die an Antigen-spezifische T-Zellrezeptoren binden und somit durchflusszytometrisch untersucht werden können.

Die Analyse von MHC II-Tetramerantworten erfolgte bei den prophylaktischen Vakzinierungsexperimenten 3 Tage nach der Belastungsinfektion mit 500 SFFU in der Milz. Hierzu wurden die Einzelzellsuspensionen in RPMI-Medium aufgenommen, das zusätzlich Glutamat und Pyruvat enthielt. Für die Tetramer II-Färbung wurden 25 µl mit $2,5 \cdot 10^6$ Zellen eingesetzt und mit demselben Volumen 1 : 250 verdünntem PE-MHC II-Tetramer für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Oberflächenfärbung erfolgte 30 min vor Ende der Inkubation durch Zugabe der entsprechenden

Antikörper. Die Zellen wurden danach mit FACS-Puffer gewaschen und durchflusszytometrisch untersucht.

Die Analyse von MHC I-Tetramerantworten erfolgte aus Blut- sowie Milz- und Lymphknotenzellen. Das MHC I-Tetramer wurde dabei standardmäßig mit 1 µl/Probe in der Oberflächenfärbung (vgl. 4.4.7.2) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte dann für 20 - 30 min bei RT im Dunklen. Anschließend konnten die Zellen weiterhin intrazellulär gefärbt werden.

4.4.7.5 Peptidstimulation

Im FV-Modell wurden die Zellen für die spezifische Stimulation mit einem CD4- oder CD8-Peptid in R10-Medium aufgenommen und $\sim 2 \cdot 10^6$ Zellen je Probe eingesetzt. Das Volumen wurde durch Zugabe von Medium auf 100 µl erweitert. Hinzu kamen 100 µl des Stimulationsansatzes, der aus R10-Medium mit 4 µg/ml BFA und 2 µg/ml Peptid bestand. Die Zellen wurden für 6 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sowohl Oberflächen- als auch intrazelluläre Marker gefärbt.

Für eine unspezifische Stimulation im FV-Modell wurde eine Nunc-Maxisorp-Platte am Vortag mit 10 µg/ml α-CD3 in 0,05 M Natriumcarbonat beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Proben auf die beschichtete Platte übertragen und auf 100 µl RPMI-Medium mit Pyruvat und Glutamat erweitert. Als Stimulationsansatz wurden 100 µl des Mediums mit jeweils 2 µg/ml BFA und α-CD28 hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 5 h bei 37 °C.

Für die spezifische Stimulation von Blutzellen im Influenza-Modell wurden die Zellen in R10-Medium aufgenommen und mit FITC α-CD107a, 2 µM Monensin und jeweils 1 µg/ml HA CD4 und HA CD8 Peptid versetzt. Die Stimulation erfolgte für 6 h bei 37 °C.

4.4.7.6 Verwendete Antikörper

Die Antikörper, die bei den FV-Experimenten verwendet wurden, sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: FACS-Färbungen der FV-Experimente

	FITC	PE	PerCP	Pe-Cy7	APC	AF700	APC-Cy7	eF450	eF605
Tet II	CD11b	TetII	CD43	CD62L		CD44	FVD		CD4
Tet I	PD1	TetI	CD43	CD62L	GzmB	CD44	FVD	CD8	
ICS CD4	IFNγ	IL6	CD43	TNFα	IL4	CD4	FVD	IL2	
ICS CD8	IFNγ		CD43	TNFα	GzmB	CD44	FVD	CD8	
T_{reg}	Foxp3	Vβ5	CD103	CD25	TNFRII	CD4	FVD	Helios	

Im Influenza-Modell wurden folgende Färbungen durchgeführt (Tabelle 2):

Tabelle 2: FACS-Färbungen der Influenza-Experimente

	FITC	PE	PE-Cy7	APC	eF710	eF450	APC-Cy7
ICS	CD107a	IFNγ	TNFα	IL2	CD4	CD8	FVD

4.5 Statistische Analysen

Statische Analysen erfolgten mithilfe der Software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Beim Vergleich von zwei Gruppen erfolgte die Analyse mittels t-Test. Beim Vergleich von mehreren Gruppen wurden eine einfaktorielle Varianzanalyse mit dem Kruskal-Wallis-Test und das Dunn-Mehrfachvergleichsverfahren angewendet. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant markiert.

5 Ergebnisse

5.1 Herstellung Adenovirus-basierter Impfvektoren

Die Herstellung adenoviraler Impfvektoren erfolgte mithilfe des AdEasy-Systems [59]. Dabei wurde das gewünschte Transgen zunächst in das Plasmid pShuttle-CMV kloniert und dieses dann homolog mit pAdEasy-1 in *E. coli* BJ5183 rekombiniert (Abbildung 11). Das entstandene Plasmid wurde in HEK 293-Zellen transfiziert, sodass infektiöse, rekombinante adenovirale Vektoren entstanden. Für die Fiber-chimären Vektoren, die den Fiberkopf und -schaft des Adenovirus Typ 35 enthielten, erfolgte die Rekombination mit dem veränderten pAdEasyF35 [106].

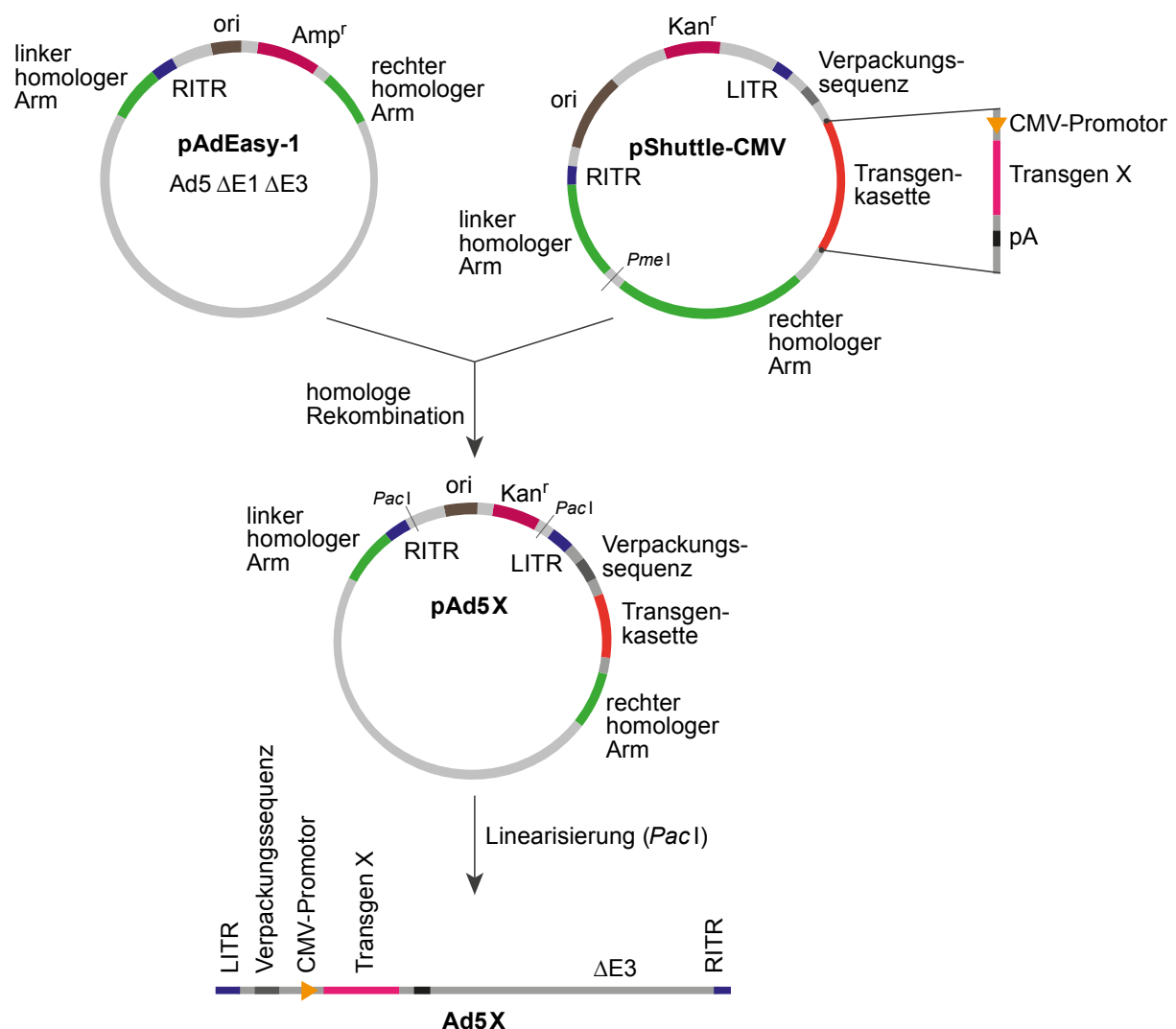


Abbildung 11: AdEasy-System

Mithilfe des AdEasy-Systems wurden rekombinante adenovirale Vektoren hergestellt. Hierzu wurde das Transgen X zunächst in das Plasmid pShuttle-CMV kloniert und durch homologe Rekombination in *E. coli* BJ5183 mit pAdEasy in adenovirale Vektoren eingebracht. Nach Linearisierung mit *PacI* erfolgte die Produktion der Viruspartikel in HEK 293-Zellen [59].

Es wurden Interleukinvektoren hergestellt, die die Interleukine IL4, IL5, IL6, IL7 bzw. IL23 kodierten. Die entsprechenden Klonierungsstrategien sind Tabelle 3 zu entnehmen, die schematische Darstellung ist in Abbildung 12 gezeigt. Die Amplifizierung der Interleukinsequenzen erfolgte jeweils mittels PCR aus muriner Gesamt-DNA.

Tabelle 3: Herstellung von Interleukin-kodierenden Vektoren

Vektor	Klonierungsstrategie
Ad.IL4	PCR-Produkt aus den Primern IL4 <i>KpnI</i> s und IL4 <i>XhoI</i> as von muriner Gesamt-DNA in Topovektor kloniert; Integration in pShuttle-CMV über <i>KpnI</i> und <i>EcoRV</i> ; Rekombination in pAdEasy-1 bzw. pAdEasyF35
Ad.IL5	PCR-Produkt aus den Primern IL5 <i>KpnI</i> s und IL5 <i>XhoI</i> as von muriner Gesamt-DNA in Topovektor kloniert; Integration in pShuttle-CMV über <i>HindIII</i> und <i>NotI</i> ; Rekombination in pAdEasy-1 bzw. pAdEasyF35
Ad.IL6	PCR-Produkt aus den Primern IL6 <i>KpnI</i> s und IL6 <i>XhoI</i> as von muriner Gesamt-DNA in Topovektor kloniert; Integration in pShuttle-CMV über <i>BamHI/BglII</i> und <i>EcoRV</i> ; Rekombination in pAdEasy-1 bzw. pAdEasyF35
Ad.IL7	PCR-Produkt aus den Primern IL7 <i>BglII</i> s und IL7 <i>XhoI</i> as von muriner Gesamt-DNA in Topovektor kloniert; Integration in pShuttle-CMV über <i>BglII</i> und <i>XhoI</i> ; Rekombination in pAdEasy-1 bzw. pAdEasyF35
Ad.IL23	PCR-Produkt aus den Primern IL23 <i>BglII</i> s und IL23 <i>NotI</i> as von muriner Gesamt-DNA in Topovektor kloniert (p15 Untereinheit); Integration in pShuttle-CMV über <i>BglII</i> und <i>NotI</i> ; PCR-Produkt aus den Primern CITES p40 <i>NotI</i> s und CITES p40 <i>EcoRV</i> as auf pUMVC3-mIL12 (p40 Untereinheit); Integration in pShuttle-CMV p15 über <i>NotI</i> und <i>EcoRV</i> ; Rekombination in pAdEasy-1 bzw. pAdEasyF35

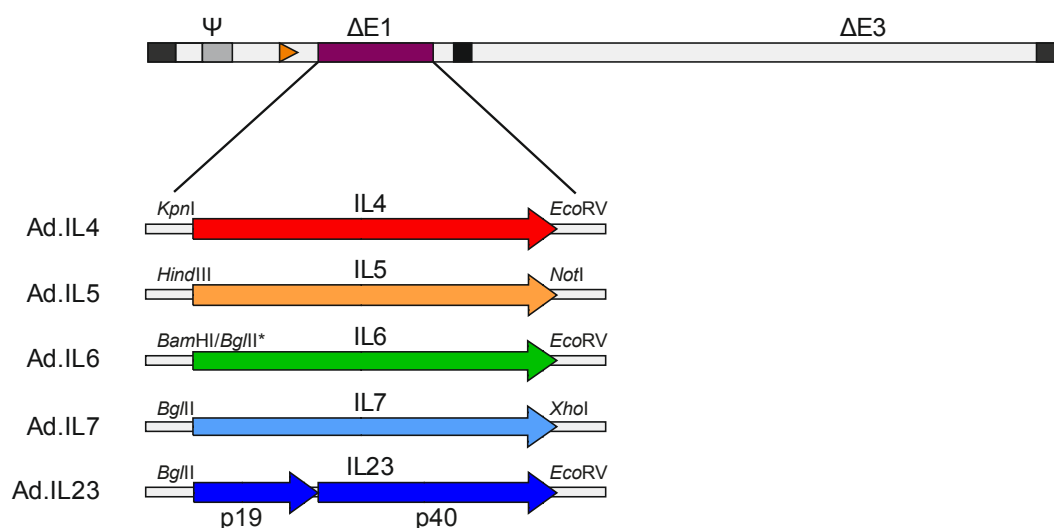


Abbildung 12: Aufbau Interleukin-kodierender, adenoviraler Vektoren

Mithilfe des AdEasy-Systems wurden rekombinante adenovirale Vektoren hergestellt, die die Interleukine IL4, IL5, IL6, IL7 oder IL23 kodierten.

Neben Interleukin-kodierenden Vektoren wurden auch Vektoren hergestellt, die spezifische Chemokine kodierten. Hierzu wurden als Transgene die Chemokine CCL1, CCL22 und CXCL13 verwendet. Die Klonierungsstrategien sind Tabelle 4 zu entnehmen, die schematische Darstellung der Vektoren ist in Abbildung 13 gezeigt. Als Ausgangsplasmide dienten gensynthetisierte Vektoren (GeneArt®, Regensburg), die die entsprechenden Chemokinsequenzen enthielten.

Tabelle 4: Herstellung Chemokin-kodierender, adenoviraler Vektoren

Vektor	Klonierungsstrategie
Ad.CCL1	Integration der Chemokinsequenz aus pMA-T_12AA4MIP CCL1 in pShuttle-CMV über <i>Bgl</i> II und <i>Not</i> I; Rekombination in AdEasy-1 bzw. AdEasyF35
Ad.CCL22	Integration der Chemokinsequenz aus pMA_12AA4MFP CCL22 in pShuttle-CMV über <i>Bgl</i> II und <i>Not</i> I; Rekombination in AdEasy-1 bzw. AdEasyF35
Ad.CXCL13	Integration der Chemokinsequenz aus pMA-T_12AA4MEP CXCL13 in pShuttle-CMV über <i>Bgl</i> II und <i>Not</i> I; Rekombination in AdEasy-1 bzw. AdEasyF35

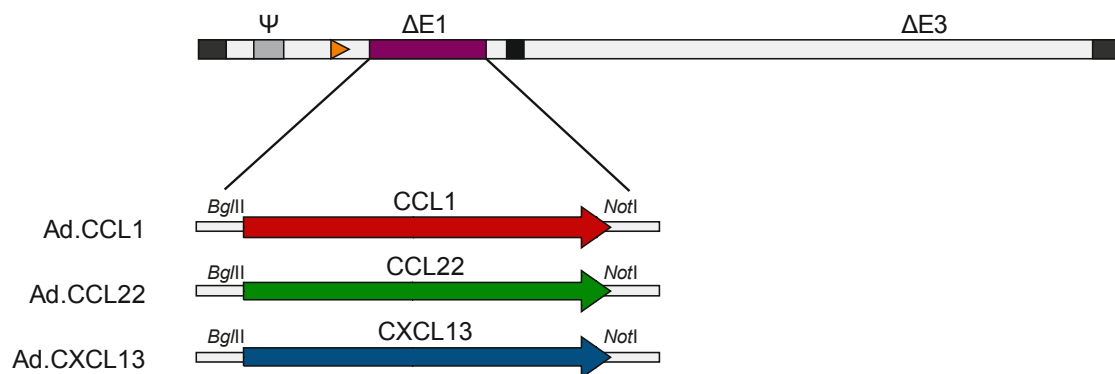


Abbildung 13: Aufbau Chemokin-kodierender, adenoviraler Vektoren

Mit Hilfe des AdEasy-Systems wurden rekombinante adenovirale Vektoren hergestellt, die die Chemokine CCL1, CCL22 oder CXCL13 kodierten.

Die Sequenz der kodierten Cytokine wurde jeweils mittels Sequenzierung und ihre Expression mittels ELISA verifiziert. Anschließend wurden die rekombinanten adenoviralen Vektoren in Zellkultur hergestellt und aufgereinigt.

Zusätzlich zu Cytokin-kodierenden, adenoviralen Vektoren erfolgte zur Steigerung der Immunantwort auch die Fusion des viralen Oberflächenproteins gp70 an das hoch-immunogene Thioredoxin. Hierzu wurden zwei verschiedene Vektoren produziert; zunächst wurde das sezernierte Thioredoxin-gp70 Fusionsprotein in adenoviralen Vektoren kodiert, so entstand der Vektor Ad.secTxngp70. Weiterhin wurde ein Vektor hergestellt, der die Eigenschaften der Vektoren Ad.pIXgp70 und Ad.secTxngp70 miteinander vereinte. Hierzu wurde das Transgen secTxngp70 in einen pIX-deletierten Vektor integriert; anschließend erfolgte die Virusanzucht in

einer modifizierten Zelllinie von HEK 293-Zellen, die pIXgp70 exprimiert [6]. Somit entstand der Vektor Ad.secTxngp70^{pIXgp70}, der secTxngp70 kodiert und gleichzeitig das pIXgp70-Fusionsprotein auf der Partikeloberfläche trägt. Zur Veranschaulichung dieser Klonierungsstrategie dient Abbildung 14, die Klonierungsstrategien sind in Tabelle 5 zusammengefasst und die Vektoren schematisch in Abbildung 15 dargestellt.

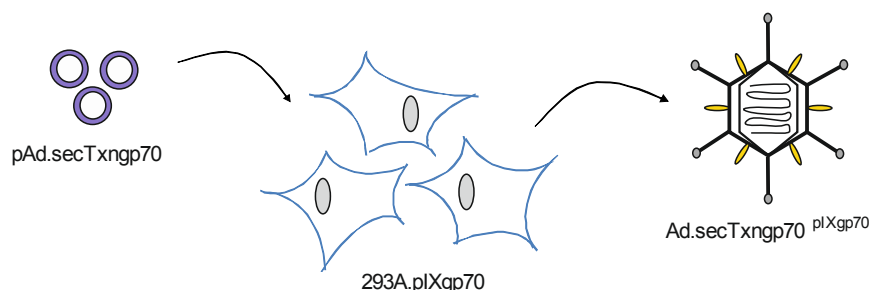


Abbildung 14: Strategie für Ad.secTxngp70^{pIXgp70}

Zur Herstellung von adenoviralen Vektoren, die an Thioredoxin (Txn) fusioniertes gp70 kodierten und gp70 gleichzeitig auf der Partikeloberfläche präsentierten, wurde der in pIX deletierte, adenovirale Vektor pAd.ΔpIXsecTxngp70 kloniert und für die Virusanzucht die pIXgp70-exprimierende Zelllinie 293A.pIXgp70 verwendet.

Tabelle 5: Adenovirale Vektoren, die Thioredoxin-gp70 Fusionsproteine kodieren

Vektor	Klonierungsstrategie
Ad.secTxngp70	Integration des Transgens gp70 aus pGemgp70 in pBelTxnGageOLLAS über <i>Bgl</i> II bzw. <i>Bam</i> HI und <i>Not</i> I; Einbau des Transgens Txngp70 aus pBelTxngp70 in pShuttlesecTxnGagLOLLAS über <i>Sal</i> I und <i>Eco</i> RV; Rekombination in pAdEasy-1 bzw. AdEasyF35.
Ad.ΔpIXsecTxngp70	Integration des Transgens secTxngp70 aus pShuttle secTxngp70 in pShuttle ΔpIXCMV-pA über <i>Bgl</i> II und <i>Not</i> I; Rekombination in AdEasy-1 bzw. AdEasyF35

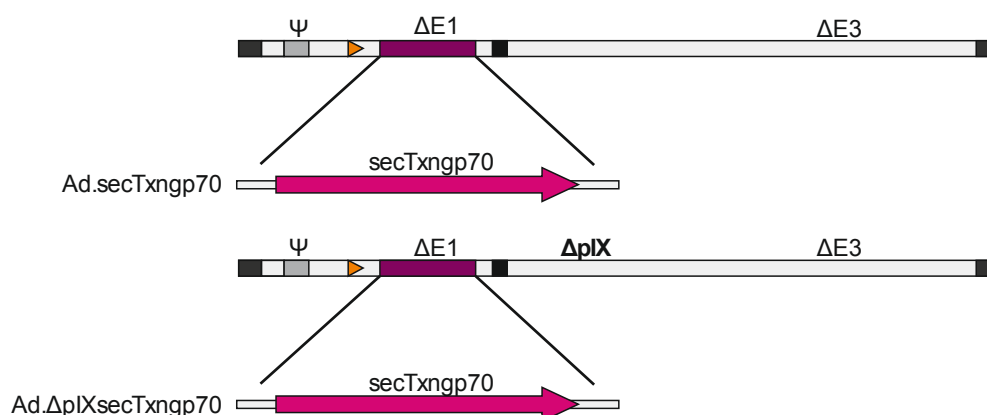


Abbildung 15: Adenovirale Vektoren mit Thioredoxin-gp70-Fusionsprotein

Es wurden adenovirale Vektoren sowie pIX-deletierte Vektoren hergestellt, die als Transgen ein sezerniertes Thioredoxin-gp70 Fusionsprotein kodierten.

5.2 Prophylaktische Immunisierungen

Für die prophylaktische Vakzinierung wurden die adjuvanten Eigenschaften der Interleukin- und Chemokin-kodierenden Vektoren in Kombination mit dem *expression/display*-Vektor Ad.pIXgp70 im FV-Modell untersucht. Weiterhin wurde der sezernierte Thioredoxin-gp70-Fusionsvektor für prophylaktische Vakzinierungen in der FV-Infektion verwendet. Die Interleukinvektoren, die im FV-Modell erfolgreich als Adjuvans verwendet wurden, wurden zusätzlich im Influenza-Modell erprobt, um ihre adjuvante Wirkung in einem weiteren Mausmodell zu untersuchen.

5.2.1 Interleukin-kodierende Vektoren als genetisches Adjuvans im FV-Modell

Da eine effiziente, anti-retrovirale Vakzine die Induktion einer komplexen Immunantwort erfordert, an der u. a. neutralisierende Antikörper beteiligt sind, diente die adjuvante Verwendung Interleukin-kodierender, adenoviraler Vektoren insbesondere der Induktion dieser Immunantworten. Wie in früheren Studien gezeigt wurde, erzeugt der *expression/display*-Vektor Ad.pIXgp70 bereits einen guten Schutz, der mit starken virusspezifischen CD4⁺ T-Zellantworten sowie bindenden Antikörpern korrelierte. Allerdings konnte die Bildung neutralisierender Antikörper erst nach einer Belastungsinfektion mit FV beobachtet werden [6].

Diesbezüglich wurden die Interleukine IL4, IL5, IL6, IL7 und IL23 für folgende Immunisierungsexperimente ausgewählt, da sie an der Verstärkung von T_H2-Antworten sowie an der Stimulation von B-Zellreifung und -funktion beteiligt sind. Auf diese Weise sollte die Antikörperproduktion verbessert werden. Um einen potenziellen Effekt koapplizierter Interleukinvektoren untersuchen zu können, musste zunächst die Immunisierungsdosis des Ad.pIXgp70-Vektors sowie die Infektionsdosis angepasst werden, sodass die Immunisierung mit diesem Vektor allein keinen guten Schutz induzierte. Hierzu wurde im Vergleich zu den vorangegangenen Experimenten die Immunisierungsdosis auf $1 \cdot 10^9$ vp reduziert (vorher $5 \cdot 10^9$ vp) und gleichzeitig die Infektionsdosis fünffach auf 2 500 SFFU FV erhöht. Für die Analyse von virusspezifischen CD4⁺ T-Zellantworten wurden die Tiere erneut mit 500 SFFU FV infiziert, weil hier die FV-Infektion nur zur nochmaligen Verstärkung der Immunantwort eingesetzt wurde. In den koimmunisierten Mäusen wurde die gleiche Dosis des Interleukin-kodierenden Vektors koappliziert; um eine identische Vektordosis in allen Mäusen zu gewährleisten, erhielten Tiere, die nur mit Ad.pIXgp70 immunisiert werden sollten, zusätzlich die entsprechende Menge eines leeren oder GFP-kodierenden Vektors (Ad.empty bzw. Ad.GFP). Suszeptible CB6F1-Mäuse wurden in einem heterologen Prime-Boost Schema im Abstand von 4 Wochen zwei Mal mit den entsprechenden Ad5 bzw. Ad5F35 Vektoren in die Plantarseite beider Hinterpfoten immunisiert. Im Vergleich zu den vorangegangenen Experimenten wurde hier der Abstand der Immunisierungen um eine Woche verlängert, da nach Immunisierung im Abstand von 4 Wochen stärkere Antikörperantworten vorlagen (Daten nicht gezeigt). Drei

Wochen nach der zweiten Impfung wurden die Versuchstiere mit FV infiziert. Sowohl Viruslasten als auch verschiedene Immunantworten wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert (Abbildung 16).

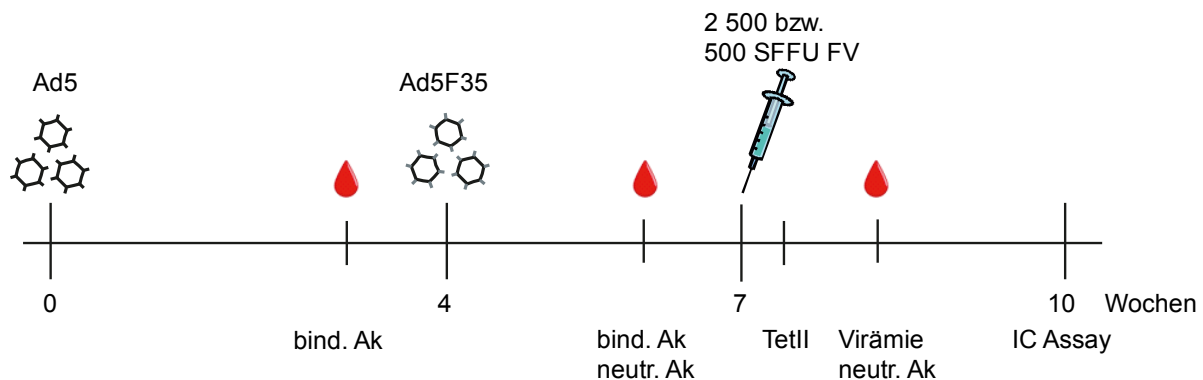


Abbildung 16: Zeitlicher Ablauf der Interleukinversuche

Für die Untersuchung der adjuvanten Wirkung koapplizierter Interleukinvektoren wurden susceptible CB6F1-Mäuse zwei Mal im Abstand von 4 Wochen heterolog mit Ad5- bzw. Ad5F35-Vektoren in die Plantarseiten beider Hinterpfoten immunisiert und nach weiteren 3 Wochen mit einer Dosis von 2 500 SFFU FV infiziert. Die Bestimmung der Viruslasten in Plasma und Milz erfolgte 10 bzw. 21 Tage nach Infektion. Die Untersuchung von bindenden Antikörpern erfolgte 3 Wochen nach der ersten sowie 2 Wochen nach der zweiten Immunisierung, neutralisierende Antikörper wurden 2 Wochen nach der zweiten Immunisierung sowie 10 Tage nach Infektion bestimmt. Die Analyse von virusspezifischen MHC II Tet⁺ CD4⁺ T-Zellen in der Milz erfolgte 3 Tage nach Infektion mit einer niedrigen Infektionsdosis von 500 SFFU FV.

5.2.1.1 Schutz vor FV-Infektion nach Koimmunisierung mit Interleukinvektoren

Da eine FV-Infektion in susceptible Mäusen eine Splenomegalie erzeugt, wurden die Mäuse drei Wochen nach Infektion getötet, Milzen entnommen und diese gewogen (Abbildung 17).

Unvazinierte sowie nur mit Ad.pIXgp70 immunisierte Mäuse entwickelten überwiegend große Milzen (Abbildung 17); die Anpassung der Vektor- sowie Infektionsdosis erlaubte also die Untersuchung eines adjuvanten Effekts der koapplizierten Interleukin-kodierenden Vektoren. Während die Koimmunisierung mit Ad.IL4 und Ad.IL7 keinen Einfluss auf die Milzgrößen hatte, führte die Applikation von adenoviralen Vektoren, die IL5, IL6 oder IL23 kodierten, zu deutlich kleineren Milzen im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen, die statistisch signifikant kleiner waren als die von unvazinierten Mäusen, jedoch nicht als Milzen von Mäusen, die mit Ad.pIXgp70 immunisiert wurden. In allen drei Gruppen bildeten lediglich einzelne Tiere große Milzen aus, wohingegen der Großteil keine Splenomegalie entwickelte.

Weiterhin wurden Viruslasten im Plasma 10 Tage und in der Milz 21 Tage nach Infektion analysiert (Abbildung 18).

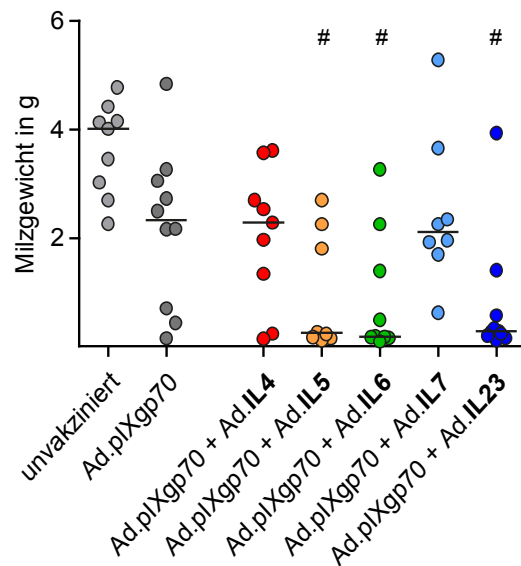


Abbildung 17: Milzgewichte nach Koimmunisierung mit Interleukinvektoren

Suszeptible Mäuse wurden zwei Mal heterolog mit den angegebenen Vektoren immunisiert und mit FV infiziert. Drei Wochen nach der Belastungsinfektion wurden die Milzen entnommen und gewogen. Dargestellt sind die Milzgewichte, statistisch signifikante Unterschiede gegenüber ungeimpften Tieren sind mit # gekennzeichnet. Jeder Punkt zeigt eine einzelne Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien gekennzeichnet. Die Daten entstanden in zwei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

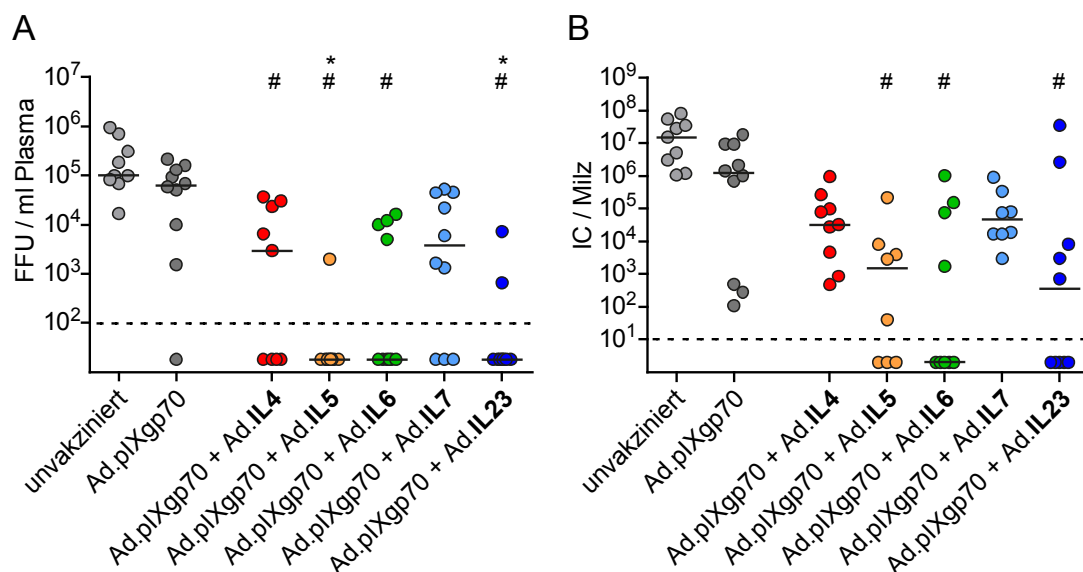


Abbildung 18: Viruslasten in Plasma und Milz nach Koimmunisierung mit Interleukinvektoren

Freies Virus im Plasma wurde 10 Tage nach Infektion (A) analysiert. Zur Bestimmung der Viruslast in der Milz wurden virusinfizierte Zellen 21 Tage nach Infektion (B) untersucht. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber unvakzinierten Tieren (#) und mit Ad.pIXgp70 immunisierten Mäusen (*) sowie Mediane der einzelnen Gruppen (—) sind eingezeichnet. Jeder Punkt kennzeichnet eine individuelle Maus. Die Daten entstanden in zwei unabhängigen Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis.

Die Analyse der Viruslasten in Plasma und Milz zeigte eine Korrelation mit der vorangegangenen Untersuchung der Milzgewichte. Während die Tiere beider Kontrollgruppen sowohl in Plasma

als auch in der Milz überwiegend hohe Viruslasten aufwiesen, sorgte insbesondere die Koimmunisierung mit Ad.IL5, Ad.IL6 oder Ad.IL23 für eine deutliche Reduktion. Im Plasma (Abbildung 18A) konnte in lediglich 1 bzw. 2 mit Ad.IL5 oder Ad.IL23 koimmunisierten Mäusen eine messbare Viruslast detektiert werden, was zu einer statistisch signifikanten Reduktion im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen führte. Auch Ad.IL6 führte zu signifikant niedrigeren Titern an freiem Virus im Plasma gegenüber ungeimpften Tieren; eine Viruslast war nur in etwa der Hälfte der mit Ad.IL6 koimmunisierten Tiere detektierbar. Auch die Koimmunisierung mit Ad.IL4 führte zu einer signifikant niedrigeren Viruslast im Plasma im Vergleich zu ungeimpften Tieren. In der Milz (Abbildung 18B) waren Effekte in den mit Ad.IL5, Ad.IL6 oder Ad.IL23 koimmunisierten Mäusen zu beobachten, die sich in signifikant niedrigeren Viruslasten im Vergleich zu unvakzinierten Mäusen zeigten.

5.2.1.2 Analyse von Immunantworten nach Koimmunisierung mit Interleukinvektoren

Um herauszufinden, welche Komponenten des Immunsystems für den verbesserten Schutz verantwortlich waren, wurden verschiedene Immunantworten zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Hierzu zählte die Untersuchung virusspezifischer CD4⁺ T-Zellantworten drei Tage nach Infektion in der Milz (Abbildung 19), sowie die Analyse von bindenden Antikörpern (Abbildung 20) nach jeder Immunisierung und von neutralisierenden Antikörpern nach der zweiten Immunisierung (Abbildung 21) sowie nach Belastungsinfektion (Abbildung 22).

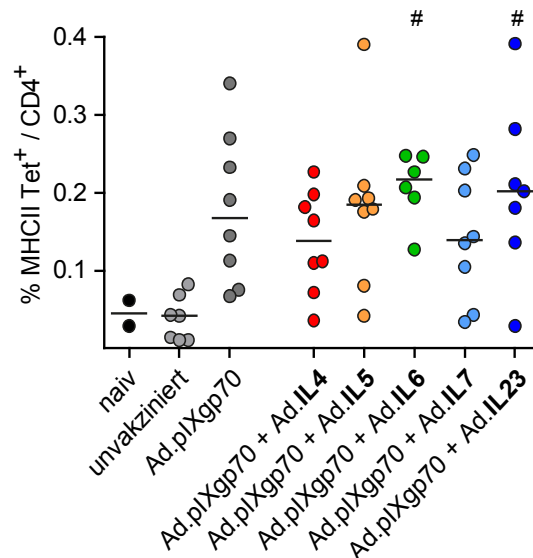


Abbildung 19: Virusspezifische CD4⁺ T-Zellantworten nach Koapplikation der Interleukinvektoren

Suszeptible CB6F1-Mäuse wurden heterolog mit den angegebenen Vektoren immunisiert und 3 Wochen nach der zweiten Immunisierung mit 500 SFFU FV infiziert. Die Analyse virusspezifischer CD4⁺ T-Zellen erfolgte durchflusszytometrisch 3 Tage nach Infektion in der Milz. Mediane sind durch waagerechte Linien, statistisch signifikante Unterschiede gegenüber unvakzinierten Tieren durch # eingezeichnet, jeder Punkt kennzeichnet eine individuelle Maus, die Daten entstanden in zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

Die Analyse virusspezifischer CD4⁺ T-Zellen erfolgte mithilfe der Tetramertechnologie 3 Tage nach Infektion mit einer niedrigen Virusdosis von 500 SFFU FV in der Milz. Verwendet wurde hierzu ein MHC II-Tetramer, welches das immundominante CD4⁺ Epitop aus F-MuLV Env (fn20 Peptid, EPLTSLTPRCNTAWNRLKL) enthält. In vorangegangenen Experimenten führte die Immunisierung mit Ad.pIXgp70 zu guten virusspezifischen CD4⁺ T-Zellantworten [6]. In Abbildung 19 ist gezeigt, dass dieser Vektor trotz Verwendung einer auf ein Fünftel reduzierten Immunisierungsdosis weiterhin gute Antworten induzierte, die aber nicht signifikant gegenüber unvaksinieren Tieren waren. In naiven sowie ungeimpften Mäusen wurden nur geringe virusspezifische T-Zellantworten detektiert. Die Koimmunisierung mit Ad.IL6 oder Ad.IL23 führte zu einem signifikanten Anstieg dieser Antworten im Vergleich zu ungeimpften Tieren; gegenüber mit Ad.pIXgp70 geimpften Tieren konnten lediglich leichte, jedoch nicht signifikante Unterschiede festgestellt werden.

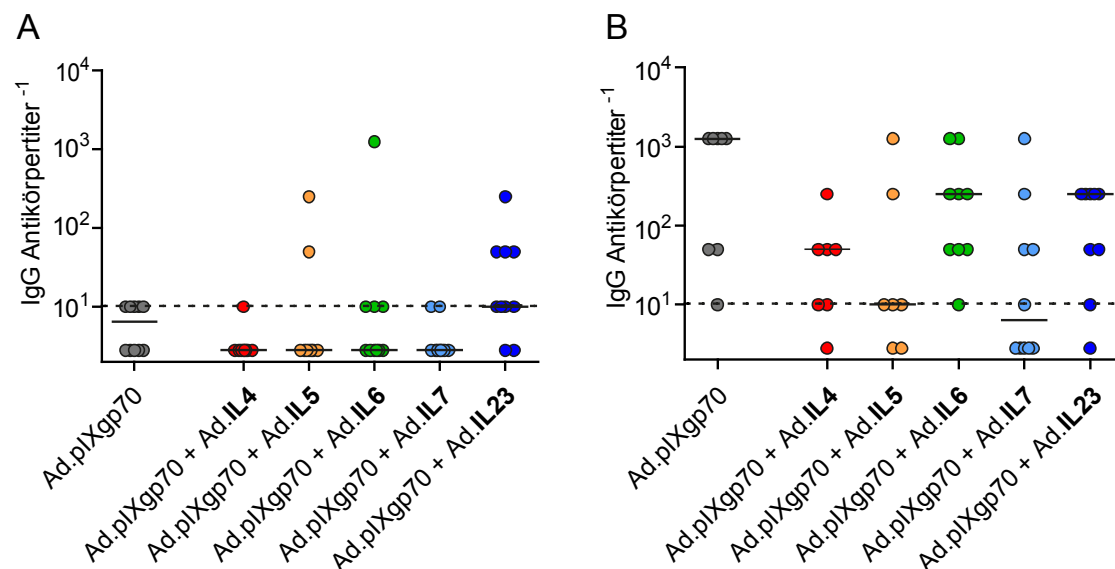
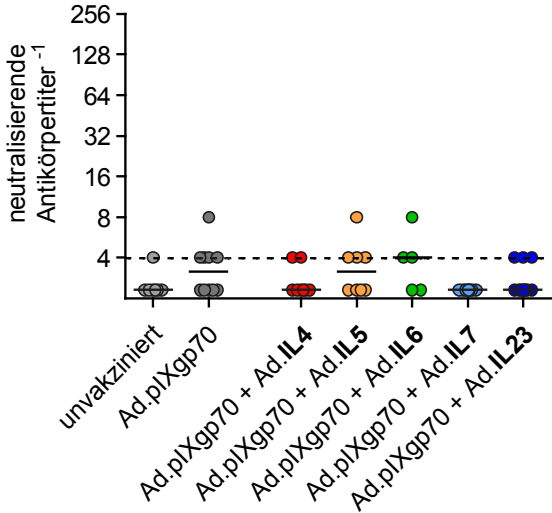


Abbildung 20: Bindende Antikörperantworten nach der ersten und zweiten Immunisierung

Suszeptible CB6F1-Mäuse wurden heterolog mit den angegebenen adenoviralen Vektoren im Abstand von 4 Wochen immunisiert. Die Bestimmung bindender Antikörper erfolgte 3 Wochen nach der ersten (A) sowie 2 Wochen nach der zweiten Immunisierung (B). Jeder Punkt kennzeichnet eine einzelne Maus und Mediane sind durch waagerechte Linien eingezeichnet. Die Daten entstanden in zwei unabhängigen durchgeführten Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis.

Auch gute bindende Antikörperantworten konnten bereits allein durch Ad.pIXgp70 ausgelöst werden [6]. Nach der ersten Immunisierung waren in allen Gruppen nur schwache Antikörperantworten detektierbar (Abbildung 20A); als positiv galten dabei Verdünnungen, deren Absorptionswerte oberhalb des dreifachen Werts von ungeimpften Tieren lagen. Nach der zweiten Immunisierung induzierte Ad.pIXgp70 allein bereits starke bindende Antikörpertiter (Abbildung 20B). In den mit Interleukinvektoren koimmunisierten Mäusen ist keine weitere Verbesserung dieser Antworten zu erkennen. Auch die Analysen der Subtypen IgG1 und IgG2a

Schließlich wurden neutralisierende Antikörperantworten untersucht. Die Induktion von neutralisierenden Antikörpern durch eine anti-retrovirale Vakzine ist schwierig, und nach Immunisierung mit Ad.pIXgp70 wurden neutralisierende Antikörper erst nach Belastungsinfektion detektiert [6].



Suszeptible Mäuse wurden zwei Mal heterolog mit Ad.pIXgp70 in Kombination mit den verschiedenen Interleukinvektoren immunisiert. Die Analyse neutralisierender Antikörper erfolgte zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung. Die Daten entstanden in zwei unabhängigen Experimenten, jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus und Mediane sind durch waagerechte Linien gekennzeichnet.

Die Vakzine Ad.pIXgp70 konnte keine neutralisierenden Antikörper vor der Belastungsinfektion induzieren. Auch in den koimmunisierten Mäusen wurden zu diesem Zeitpunkt keine neutralisierenden Antikörper nachgewiesen (Abbildung 21).

Während keine Effekte auf neutralisierende Antikörper nach der zweiten Immunisierung herausgestellt werden konnten, sind Unterschiede 10 Tage nach der Belastungsinfektion detektierbar (Abbildung 22). Ad.pIXgp70 allein induzierte lediglich geringe Antikörperantworten, wohingegen mit Ad.IL5 oder Ad.IL23 koimmunisierte Mäuse deutlich höhere Titer aufwiesen, die statistisch signifikant höher waren im Vergleich zu ungeimpften Tieren. Auch die Koapplikation von adenoviralen Vektoren, die IL6 oder IL7 kodierten, führten zu einer leichten Verbesserung, die jedoch nicht signifikant war. Noch deutlicher wurden die Unterschiede bei der Betrachtung des Klassenwechsels zu neutralisierenden IgG-Antikörpern (Abbildung 22B). In beiden Kontrollgruppen sind lediglich in einzelnen Tieren neutralisierende IgG-Antikörper nachweisbar, aber insbesondere die Koimmunisierung mit Ad.IL5, Ad.IL6 oder Ad.IL23 führte zu erhöhten Titern; signifikante Unterschiede wurden nur nach Koimmunisierung mit Ad.IL5 im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen detektiert. Diese

Ergebnisse korrelierten mit dem beobachteten verbesserten Impfschutz in Mäusen, die mit Ad.IL5, Ad.IL6 oder Ad.IL23 koimmunisiert wurden.

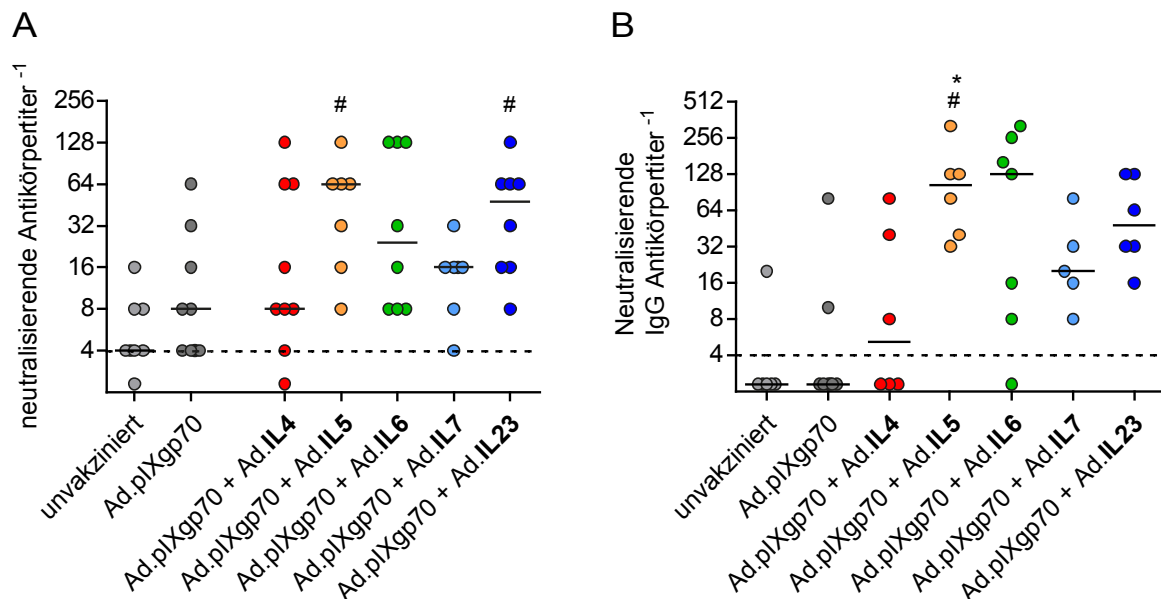


Abbildung 22: Neutralisierende Antikörper nach Belastungsinfektion

Suszeptible Mäuse wurden heterolog mit Ad.pIXgp70 in Kombination mit Interleukin-kodierenden Vektoren geimpft und 3 Wochen nach der zweiten Immunisierung mit FV infiziert. Die Analyse von gesamten neutralisierenden (A) sowie neutralisierenden IgG-Antikörpern (B) erfolgte 10 Tage nach Infektion. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber unvazinierten (#) sowie mit Ad.pIXgp70 immunisierten Mäusen (*) sind gekennzeichnet. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien dargestellt. Die Daten entstanden in zwei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

Zusammenfassend konnte durch die Koimmunisierung mit adenoviralen Vektoren, die die Interleukine IL5, IL6 oder IL23 exprimierten, der Impfschutz des *expression/display*-Vektors Ad.pIXgp70 weiter verbessert werden. Dies zeigte sich in niedrigeren Milzgewichten sowie in geringeren Viruslasten in Plasma und Milz nach Belastungsinfektion mit einer hohen Dosis FV. Bei der Untersuchung verschiedener Immunantworten stellte sich heraus, dass IL6 und IL23 zu einer leichten Erhöhung von bereits starken CD4⁺ T-Zellantworten führte, die signifikant höher waren gegenüber ungeimpften Tieren. Der deutlichere adjuvante Effekt wurde im Zusammenhang mit neutralisierenden Antikörpern beobachtet. Zwar konnten auch durch die koapplizierten Interleukinvektoren keine neutralisierenden Antikörper vor der Belastungsinfektion induziert werden, dennoch führte die Koimmunisierung nach der Belastungsinfektion zu deutlich stärkeren neutralisierenden Antikörperantworten, die nach Koimmunisierung mit Ad.IL5 oder Ad.IL23 signifikant höher waren als in ungeimpften Tieren. Die Koimmunisierung mit Ad.IL5 führte auch zu einem schnelleren Antikörper-Klassenwechsel zu neutralisierenden IgG-Antikörpern, der sich in signifikant höheren Titern gegenüber beider Kontrollgruppen zeigte.

5.2.2 Interleukinvektoren als genetisches Adjuvans im Influenzavirus-Modell

Nach der erfolgreichen Verwendung der adenoviralen Vektoren Ad.IL5, Ad.IL6 und Ad.IL23 als genetisches Adjuvans im FV-Modell, wurde ihre adjuvante Wirkung im Influenzavirus-Modell untersucht. Da hier kein *expression/display*- und auch kein Ad5F35-Vektor zur Verfügung stand, wurde für die Vakzinierungsexperimente ein konventioneller Vektor Ad5.HA verwendet, der das Oberflächenprotein Hämagglutinin H1 von Influenza A (PR/8/34) kodierte. Balb/c Mäuse wurden im Abstand von 3 Wochen zwei Mal homolog jeweils mit Ad5-basierten Vektoren intramuskulär geimpft, nach weiteren drei Wochen mit 2 500 PFU Influenzavirus intranasal infiziert und der Krankheitsverlauf sowie verschiedene Immunantworten analysiert (vgl. Abbildung 23).

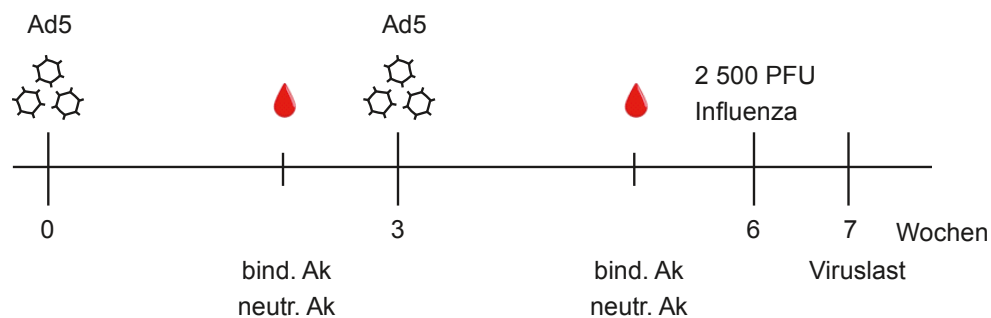


Abbildung 23: Zeitlicher Ablauf der Influenzaversuche

Im Influenza-Modell wurden Balb/c-Mäuse homolog mit Ad5-Vektoren im Abstand von 3 Wochen immunisiert. Nach 3 Wochen wurden die Mäuse mit 2 500 PFU Influenzavirus intranasal infiziert, danach wurde täglich das Gewicht bestimmt und 6 Tage nach Infektion erfolgte die Analyse der Viruslasten. Jeweils 2 Wochen nach jeder Immunisierung wurden bindende und neutralisierende Antikörper bestimmt.

5.2.2.1 Schutz vor Influenzavirus-Infektion

Balb/c Mäuse wurden zweimal im Abstand von 3 Wochen mit jeweils $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.HA sowie eines Interleukinvektors bzw. leeren adenoviralen Vektors intramuskulär geimpft. Drei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Tiere mit 2 500 PFU Influenzavirus intranasal infiziert. Danach wurden die Mäuse täglich gewogen (Abbildung 24), um einen möglichen Gewichtsverlust zu dokumentieren. Sechs Tage nach Infektion wurden die Viruslasten in der bronchoalveolären Lavage (BAL) und der Lunge bestimmt (Abbildung 25).

In den ungeimpften Kontrolltieren reduzierte sich das Gewicht innerhalb von 6 Tagen um etwa 30 % (Abbildung 24). Die Mäuse, die mit Ad5.HA immunisiert wurden, wiesen keinen Gewichtsverlust auf. Und auch in Mäusen, die mit den Interleukin-kodierenden Vektoren koimmunisiert wurden, führte die Infektion zu keiner Gewichtsreduktion.

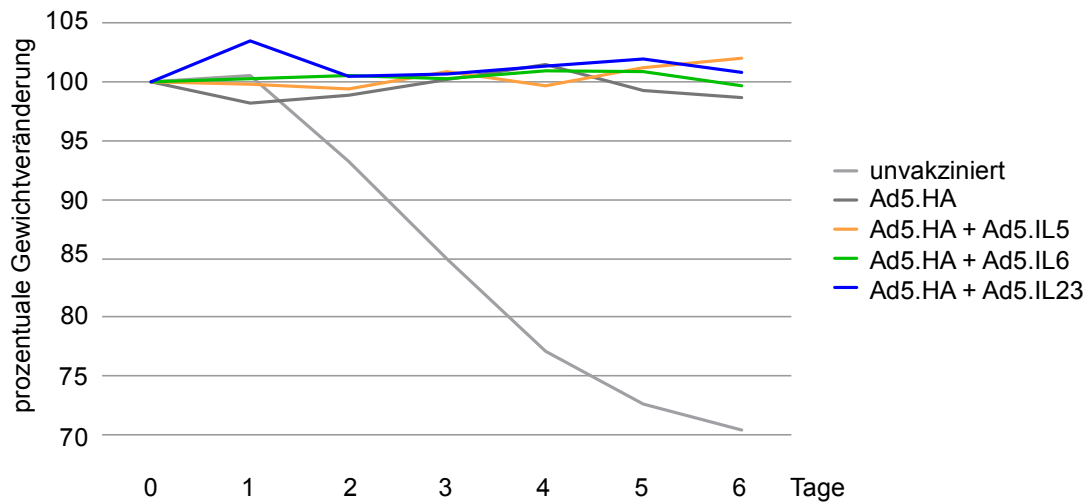


Abbildung 24: Gewichtsverlauf der Versuchstiere nach Influenzainfektion

Die Versuchstiere wurden im Abstand von 3 Wochen zwei Mal mit Ad5.HA in Kombination mit den adenoviralen Interleukinvektoren immunisiert und nach weiteren 3 Wochen mit Influenzavirus infiziert. Nach Infektion wurden die Tiere täglich gewogen und der prozentuale Gewichtsverlust in Bezug auf das Ausgangsgewicht ermittelt. Die Daten stammen aus einem Experiment.

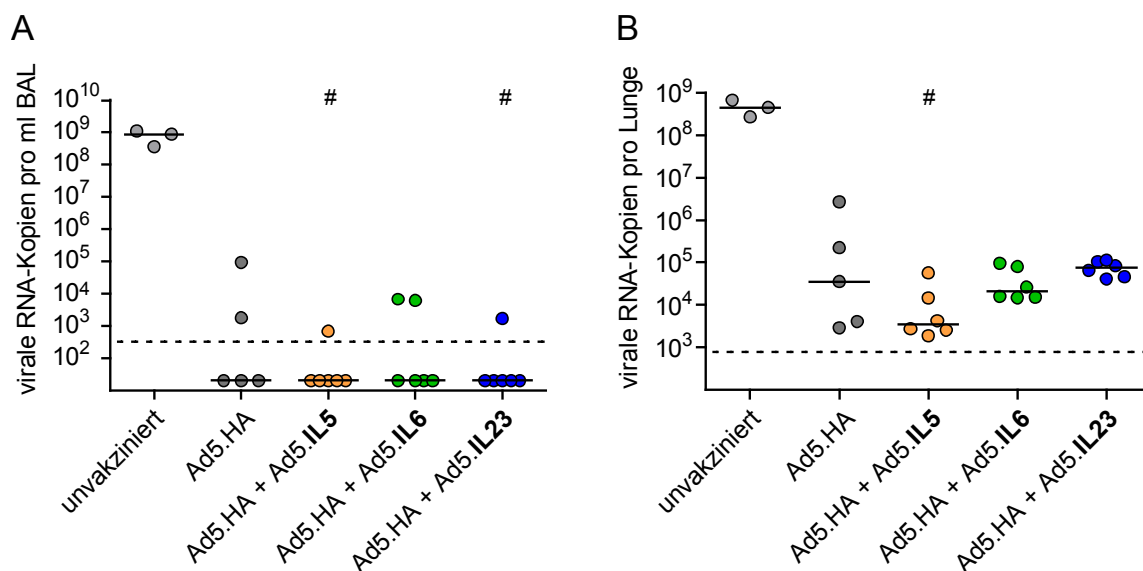


Abbildung 25: Viruslasten in BAL und Lunge nach Influenzainfektion

Sechs Tage nach der Infektion zweifach immunisierter Mäuse wurden die Viruslasten in BAL (A) und Lunge (B) bestimmt. Jeder Punkt zeigt eine einzelne Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien gekennzeichnet und die Daten stammen aus einem Experiment. Die Nachweisgrenzen der RT-PCR liegen bei 428 Kopien/ml BAL bzw. 856 Kopien/Lunge. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber unvaxinierten Tieren sind mit # gekennzeichnet.

Ähnliche Ergebnisse lieferte die Analyse der Viruslasten (Abbildung 25). In ungeimpften Tieren wurden sehr hohe Kopienzahlen viraler RNA in BAL und Lunge nachgewiesen. Die Immunisierung mit Ad5.HA führte in beiden Analysen zu einer Reduktion, die jedoch nicht signifikant im Vergleich zu den ungeimpften Tieren war. In der BAL wurden in allen immunisierten Mäusen lediglich in einzelnen Tieren Viruskopien nachgewiesen, signifikante Unterschiede im Vergleich zu ungeimpften Tieren waren nach Koimmunisierung mit Ad5.IL5 oder

Ad.IL23 detektierbar. Auch in der Lunge lagen die Viruslasten aller immunisierten Tiere unterhalb der Viruskopien ungeimpfter Kontrollmäuse. Nach der Koimmunisierung mit Ad.IL5 waren die Viruslasten in der Lunge signifikant niedriger als in ungeimpften Tieren.

Da die Immunisierung mit dem Vektor Ad5.HA bereits zu einem guten Schutz vor der Influenzavirus-Infektion führte, war die Untersuchung eines potenziellen adjuvanten Effekts der koapplizierten Interleukin-kodierenden Vektoren schwierig. In allen ko-immunisierten Tieren ließen sich keine Unterschiede bei der Analyse des Gewichtsverlust und der Viruslasten im Vergleich zu den mit Ad5.HA geimpften Tieren detektieren.

5.2.2.2 Analyse von Immunantworten nach Koimmunisierung mit Interleukinvektoren

Zusätzlich wurden auch im Influenza-Modell bindende und neutralisierende Antikörperantworten jeweils zwei Wochen nach jeder Immunisierung analysiert.

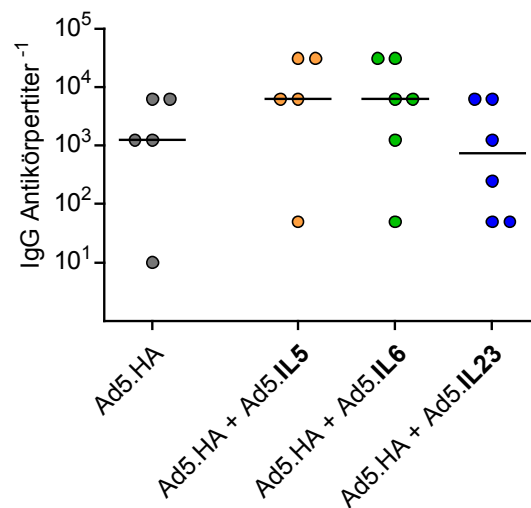


Abbildung 26: Bindende Antikörper nach der zweiten Immunisierung

Zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung mit Ad5.HA in Kombination mit den Interleukin-kodierenden adenoviralen Vektoren wurden bindende Antikörper im Blut detektiert. Jeder Punkt zeigt eine Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien gekennzeichnet und die Daten stammen aus einem Experiment.

Nach der ersten Immunisierung wurden nur sehr geringe bindende Antikörpertiter nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Nach der zweiten Immunisierung (Abbildung 26) waren die Titer in allen immunisierten Mäusen insgesamt höher. Die Koimmunisierung mit Ad5.IL5 und Ad5.IL6 führte dabei zu einer leichten Erhöhung im Vergleich zur mit Ad5.HA immunisierten Kontrollgruppe, die statistisch allerdings nicht signifikant war. Ad5.IL23 hatte keinen adjuvanten Effekt. Im Gegensatz zum FV-Modell konnten bereits vor der Influenza-Infektion neutralisierende Antikörpertiter detektiert werden (Abbildung 27).

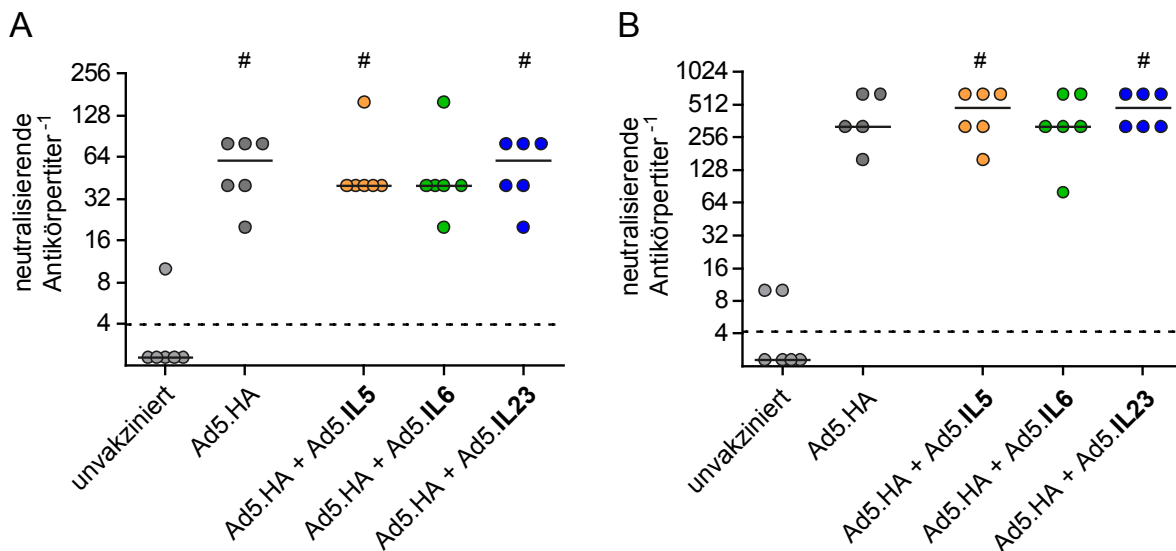


Abbildung 27: Neutralisierende Antikörper nach der ersten und zweiten Immunisierung

Sowohl zwei Wochen nach der ersten (A) als auch nach der zweiten Immunisierung (B) wurden neutralisierende Antikörperantworten analysiert. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien und statistisch signifikante Unterschiede gegenüber unvakzinierten Mäusen mit # gekennzeichnet. Die Daten stammen aus einem Experiment.

Bereits nach einer Immunisierung konnten in allen immunisierten Mäusen neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 27), die in mit Ad5.HA sowie mit Ad5.IL5 oder Ad5.IL23 koimmunisierten Mäusen signifikant höher waren im Vergleich zu ungeimpften Tieren. Diese Antworten wurden durch die zweite Impfung weiter verstärkt, sodass insgesamt hohe Titer nach zwei Immunisierungen detektierbar waren; in mit Ad5.IL5 oder Ad5.IL23 koimmunisierten Tieren waren die Titer nach der zweiten Immunisierung gegenüber ungeimpften Mäusen signifikant höher. Da allerdings der Vektor Ad5.HA allein bereits hohe neutralisierende Antikörpertiter induzierte, war es nicht möglich, adjuvante Effekte sicher festzustellen.

Da bereits beim Schutz zu erkennen war, dass der konventionelle adenovirale HA-Vektor in der eingesetzten Dosis einen guten Schutz induzierte, konnten keine adjuvanten Effekte der koapplizierten Interleukinvektoren herausgestellt werden. Allerdings ließen sich Unterschiede in den Viruslasten und neutralisierenden IgG-Antikörpern detektieren, die nur in den mit Ad5.IL5 koimmunisierten Tieren signifikant gegenüber ungeimpften Mäusen waren, sodass die Koimmunisierung mit Ad5.IL5 möglicherweise den Schutz weiter verbessern könnte. Um einen adjuvanten Effekt sicher feststellen zu können, müssten die Experimente mit einer angepassten Immunisierungsdosis des Vektors Ad5.HA wiederholt werden, bei der dieser Vektor allein nicht bereits einen sehr guten Schutz induziert.

5.2.3 Chemokin-kodierende Impfvektoren als genetisches Adjuvans im FV-Modell

5.2.3.1 Schutz vor FV-Infektion

Neben der Verwendung der Interleukin-kodierenden Vektoren wurden verschiedene Chemokine in Bezug auf ihr adjuvantes Potenzial untersucht. Die Experimente erfolgten analog zu den vorangegangenen Versuchen mit den Interleukinvektoren im FV-Modell (vgl. Abbildung 16), allerdings wurden die adenoviralen Vektoren hier intramuskulär appliziert. Suszeptible CB6F1-Mäuse wurden zwei Mal heterolog im Abstand von 4 Wochen mit Ad5 bzw. Ad5F35 Vektoren von Ad.pIXgp70 in Kombination mit den Chemokin-kodierenden Vektoren Ad.CCL1, Ad.CCL22 oder Ad.CXCL13 immunisiert. Drei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Versuchstiere mit 2 500 SFFU FV infiziert und der Krankheitsverlauf sowie verschiedene Immunantworten untersucht. Da für die Koimmunisierung mit Ad.CXCL13 nur 2 Tiere zur Verfügung standen, können aufgrund der niedrigen Tierzahl keine Aussagen über das adjuvante Potenzial dieses Vektors getroffen werden. Zunächst erfolgte die Analyse der Milzgewichte drei Wochen nach Infektion (Abbildung 28).

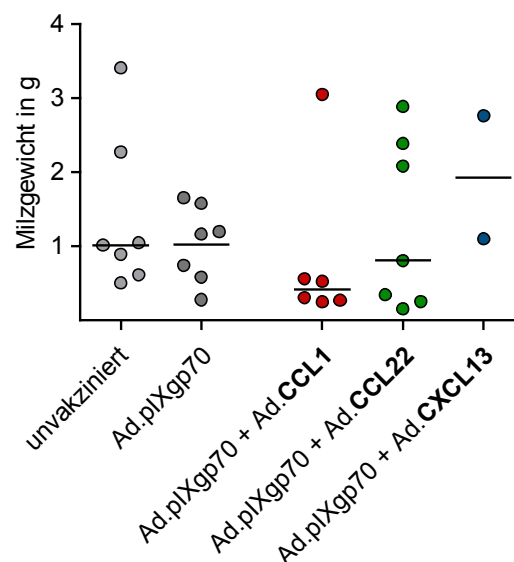


Abbildung 28: Milzgewichte nach Koimmunisierung mit Chemokinvektoren

Heterolog immunisierte Mäuse wurden mit FV infiziert und nach 3 Wochen wurden die Milzen entnommen und gewogen. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien gekennzeichnet. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis, für Ad.CXCL13 aus einem Experiment.

Nach der Immunisierung mit Ad.pIXgp70 und anschließender Infektion entwickelten sich trotz hoher Infektionsdosis nur leicht vergrößerte Milzen und auch ungeimpfte Mäuse bildeten nicht die erwartete massive Splenomegalie aus (Abbildung 28); aufgrund der unerwarteten Ergebnisse für die Kontrollgruppen sind die Daten nur schwer zu interpretieren. Dennoch ließen sich leichte, aber keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den koimmunisierten Mäusen beobachten. Die Koapplikation von Ad.CCL1 führte zu niedrigeren Milzgewichten und die Koimmunisierung mit Ad.CCL22 hatte nur in etwa der Hälfte der Tiere einen schützenden Effekt.

Weiterhin wurden die Viruslasten in Plasma 10 Tage und in der Milz 21 Tage nach Infektion analysiert (Abbildung 29).

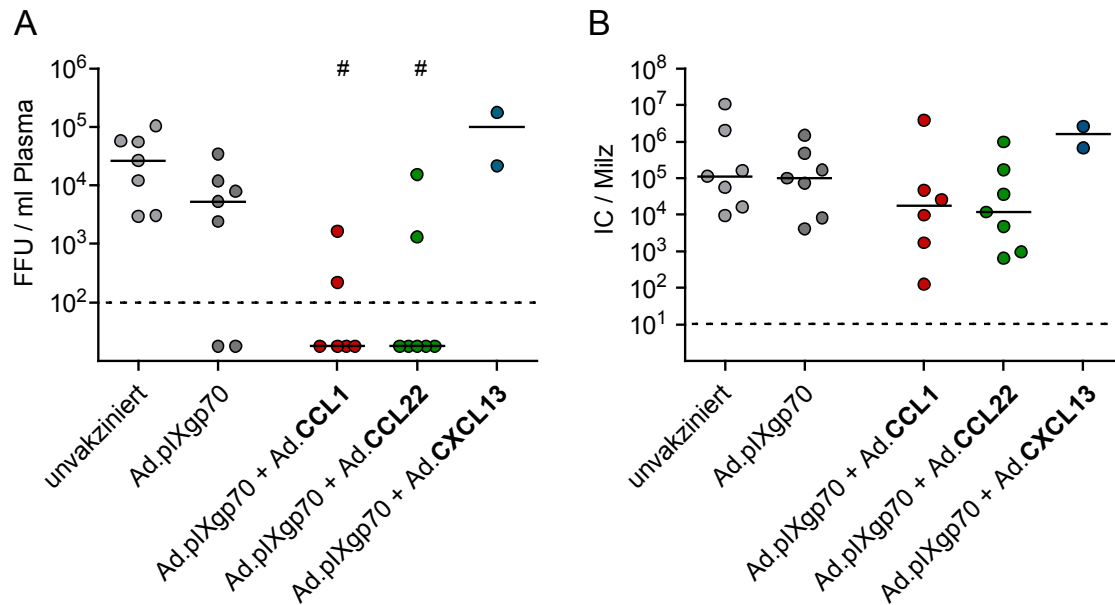


Abbildung 29: Viruslasten nach Koimmunisierung mit Chemokinvektoren

Heterolog intramuskulär immunisierte Mäuse wurden mit FV infiziert und die Viruslasten 10 Tage nach Infektion im Plasma (A) und 21 Tage nach Infektion in der Milz (B) analysiert. Die Daten stammen aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis, für Ad.CXCL13 aus einem Experiment. Jeder Punkt stellt eine individuelle Maus dar, Mediane sind durch waagerechte Linien gekennzeichnet und statistisch signifikante Unterschiede gegenüber ungeimpften Mäusen sind durch # kenntlich gemacht.

Im Vergleich zu den analogen Experimenten mit den Interleukinvektoren sind die Viruslasten beider Kontrollgruppen, ungeimpft und mit pIXgp70 immunisiert, niedriger, insbesondere bei den Viruslasten in der Milz (vgl. Abbildung 18 und Abbildung 29). Dennoch ließen sich in den Chemokin-koimmunisierten Tieren Unterschiede erkennen. Im Plasma führte die Koapplikation von Ad.CCL1 und Ad.CCL22 zu einer signifikanten Reduktion der Plasmavirämie im Vergleich zu ungeimpften Mäusen; diese war nur in jeweils 2 Tieren messbar. In der Milz hingegen ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den koimmunisierten Tieren und den Kontrollgruppen detektieren. Die Koimmunisierung mit Ad.CCL1 und Ad.CCL22 hatte nur geringen Einfluss auf die Viruslasten in der Milz.

5.2.3.2 Analyse von Antikörperantworten nach Koimmunisierung mit Chemokinvektoren

Auch nach der Koimmunisierung mit Chemokin-kodierenden Vektoren wurden humorale Immunantworten untersucht. Bindende Antikörper wurden zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung und neutralisierende Antikörper 10 Tage nach Infektion analysiert (Abbildung 30).

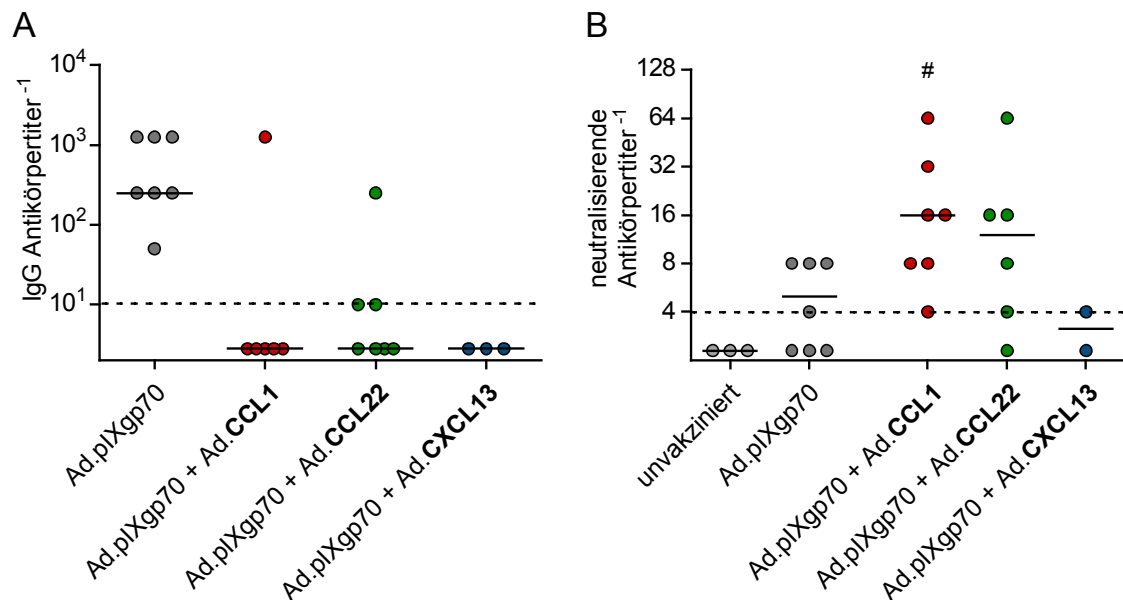


Abbildung 30: Humorale Immunantworten nach Koimmunisierung mit Chemokinvektoren

Nach der heterologen Immunisierung mit Ad.pIXgp70 in Kombination mit verschiedenen Chemokin-kodierenden Vektoren wurden zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung bindende Antikörper (A) sowie 10 Tage nach Belastungsinfektion neutralisierende Antikörpertiter (B) analysiert. Jeder Punkt zeigt eine einzelne Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien, statistisch signifikante Unterschiede gegenüber ungeimpften Tieren mit # gekennzeichnet. Die Daten stammen mit Ausnahme von Ad.CXCL13 (nur 1 Experiment) aus zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis.

Die Analyse bindender Antikörper nach der zweiten Immunisierung ergab, dass die Immunisierung mit Ad.pIXgp70 alleine zu starken bindenden Antikörperantworten führte (Abbildung 30A). In den mit Chemokin-kodierenden Vektoren koimmunisierten Mäusen konnten allerdings nur in einzelnen Mäusen bindende Antikörper nachgewiesen werden. Diese Immunantworten korrelierten folglich nicht mit dem verbesserten Immunschutz. Bei der Analyse neutralisierender Antikörper 10 Tage nach der Belastungsinfektion waren stärkere Unterschiede erkennbar (Abbildung 30B). Die Immunisierung mit Ad.pIXgp70 führte zu niedrigen Titern, die durch die Koimmunisierung mit Ad.CCL1 oder Ad.CCL22 gesteigert werden konnten; jedoch wiesen nur mit Ad.CCL1 koimmunisierte Mäuse signifikant höhere Titer im Vergleich zu ungeimpften Tieren auf. Insgesamt waren die Titer aber niedriger als die, die durch die Koimmunisierung mit den Interleukinvektoren Ad.IL5 oder Ad.IL23 ausgelöst wurden (vgl. Abbildung 22). Die erhöhten Titer neutralisierender Antikörper durch Ad.CCL1 korrelierten mit der signifikanten Reduktion der Viruslast im Plasma.

5.2.4 Thioredoxin-gp70-Fusionsproteine als genetisches Adjuvans im FV-Modell

Neben der Koimmunisierung mit verschiedenen Cytokin-kodierenden Vektoren wurde im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung einer adenoviralen Vakzine untersucht, die ein immunogenes Thioredoxin-Env gp70-Fusionsprotein kodiert. Thioredoxin ist ein zelluläres Enzym, das an Redoxprozessen beteiligt ist, und dessen chemotaktische und immunstimulatorische

Eigenschaften in Vakzinen genutzt werden können [10]. In verschiedenen Mausexperimenten wurde dieser Vektor zunächst allein sowie in Kombination mit Ad.pIXgp70 verabreicht. Suszeptible CB6F1-Mäuse wurden heterolog mit Ad5- bzw. Ad5F35-Vektoren in die Plantarseiten beider Hinterpfoten geimpft und mit FV infiziert. Drei Wochen nach der Infektion wurden die Milzen der Versuchstiere entnommen und gewogen (Abbildung 31).

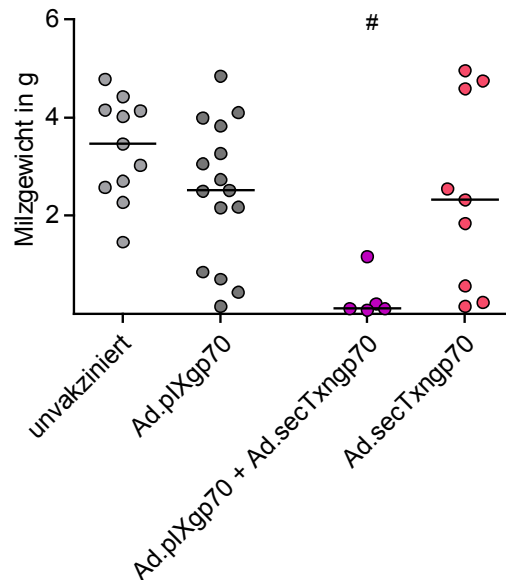


Abbildung 31: Milzgewichte nach Immunisierung mit Ad.secTxngp70

Nach zweimaliger, heterologer Immunisierung mit den angegebenen Vektoren wurden die Mäuse mit FV infiziert und die Milzgewichte drei Wochen nach Infektion ermittelt. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber unvakzinierten Tieren sind mit # gekennzeichnet. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien gezeigt.

Lediglich die kombinierte Immunisierung mit den Vektoren Ad.pIXgp70 und Ad.secTxngp70 führte dazu, dass die Versuchstiere drei Wochen nach Infektion signifikant kleinere Milzen als ungeimpfte Mäuse aufwiesen. Wurde mit jeweils nur einem Vektor oder gar nicht immunisiert, entwickelten die meisten Tiere große Milzen.

Neben der Analyse der Milzgewichte wurden auch die Viruslasten in Plasma und Milz bestimmt (Abbildung 32). Auch dabei stellte sich heraus, dass nur die Kombination beider Vektoren einen Einfluss auf die Viruslasten in Plasma und Milz hatte (Abbildung 32). Der adjuvante Effekt des Vektors war so stark, dass in nur 1 von 5 Mäusen eine Viruslast in Plasma und Milz detektierbar war; die Unterschiede waren signifikant im Vergleich zu ungeimpften Tieren. Ad.secTxngp70 allein führte allerdings zu keinem Schutz, die Viruslasten waren etwa vergleichbar mit denen nach Immunisierung mit Ad.pIXgp70.

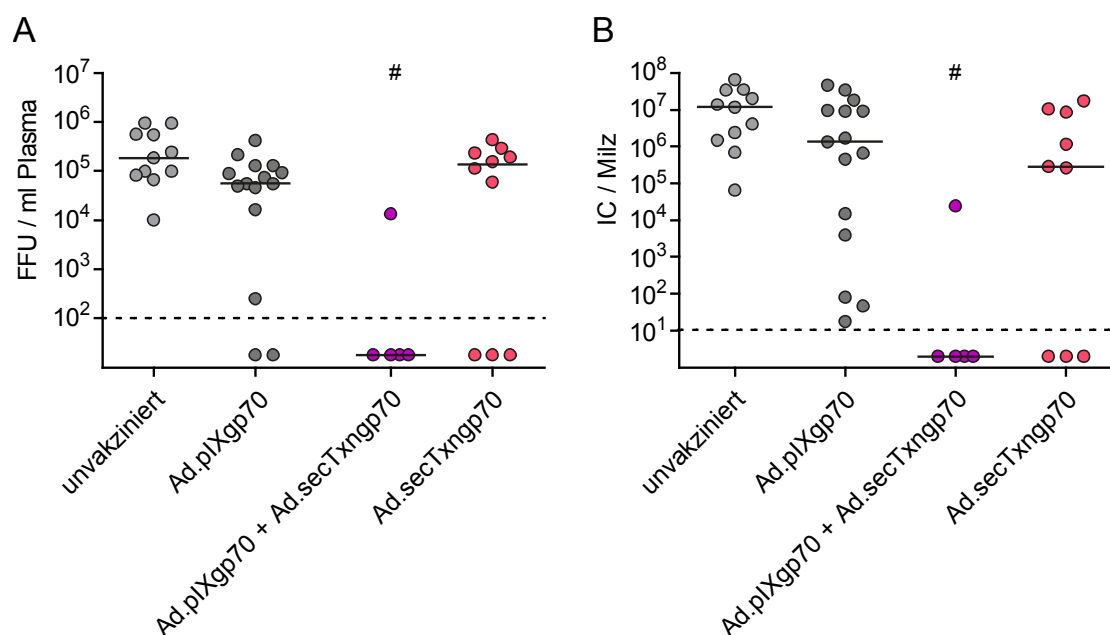


Abbildung 32: Viruslasten in Mäusen immunisiert mit Ad.secTxngp70

Suszeptible CB6F1-Mäuse wurden heterolog mit Ad5- bzw. Ad5F35-Vektoren in die Hinterpfoten geimpft und anschließend infiziert. Viruslasten wurden im Plasma 10 Tage nach Infektion (A) sowie in der Milz 21 Tage nach Infektion (B) analysiert. Jeder Punkt zeigt eine einzelne Maus, Mediane sind als waagerechte Linien, statistisch signifikante Unterschiede gegenüber ungeimpften Tieren mit # gekennzeichnet.

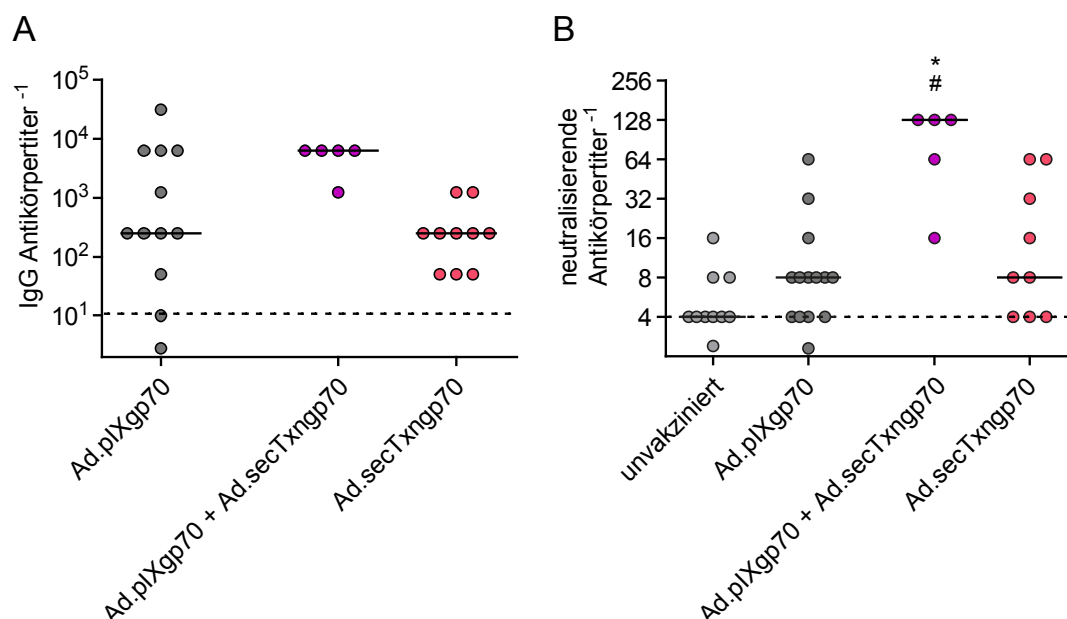


Abbildung 33: Humorale Immunantworten nach Immunisierung mit Ad.secTxngp70

Suszeptible Mäuse wurden mit den Vektoren Ad.pIXgp70 und Ad.secTxngp70 jeweils alleine oder kombiniert immunisiert und anschließend mit FV infiziert. Bindende Antikörper wurden zwei Woche nach der zweiten Immunisierung (A) und neutralisierende Antikörper 10 Tage nach Infektion analysiert (B). Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber unvakzinierten (#) sowie nur mit Ad.pIXgp70 immunisierten Mäusen (*) sind gekennzeichnet. Jeder Punkt stellt eine einzelne Maus dar, Mediane sind durch waagerechte Linien gekennzeichnet.

Neben Milzgewichten und Viruslasten wurden bindende Antikörper nach der zweiten Immunisierung und neutralisierende Antikörperantworten 10 Tage nach Belastungsinfektion untersucht (Abbildung 33). Dabei führte die Kombination der Vektoren Ad.pIXgp70 und Ad.secTxngp70 zu leicht erhöhten bindenden Antikörpertitern nach der zweiten Immunisierung, nicht aber zu signifikanten Unterschieden gegenüber der Immunisierung mit nur einem Vektor. Bei der Analyse neutralisierender Antikörper 10 Tage nach Belastungsinfektion waren die Titer in den mit beiden Vektoren immunisierten Mäusen signifikant höher gegenüber der Immunisierung mit Ad.pIXgp70 oder ungeimpften Tieren (Abbildung 33); beide Vektoren allein induzierten jeweils nur niedrigere neutralisierende Antikörperantworten.

5.2.4.1 Immunisierung mit dem Vektor Ad.secTxngp70^{pIXgp70}

Um zukünftige Immunisierungen durch Gabe nur eines Vektors zu vereinfachen und zur weiteren Optimierung der Vektorkombination wurden die Eigenschaften beider Vektoren in einem Vektor vereint. Hierzu wurde ein Vektor hergestellt, der das Transgen secTxngp70 kodiert und zusätzlich auf der Oberfläche gp70 fusioniert an das adenovirale Capsidprotein pIX besitzt (vgl. Abbildung 14). Dies wurde dadurch erreicht, dass zunächst der adenovirale Vektor Ad.ΔpIXsecTxngp70 kloniert wurde, der in der pIX-Region deletiert war und secTxngp70 als Transgen kodierte. Die Produktion der adenoviralen Partikel erfolgte dann mit der Zelllinie 293A.pIXgp70, die das pIX-gp70-Fusionsprotein exprimiert, sodass es in die Partikelmembran der adenoviralen Vektoren eingebaut wurde. Auch dieser Vektor, Ad.secTxngp70^{pIXgp70}, wurde in Vakzinierungsexperimenten in Bezug auf Schutz sowie schutzvermittelnde Immunantworten untersucht. Bei diesem Experiment ist die Aussagemöglichkeit allerdings eingeschränkt, da der Impfschutz in der Ad.pIXgp70-Kontrollgruppe so stark war, dass keine adjuvanten Effekte im Schutz, aber in den schutzvermittelnden Immunantworten detektiert werden konnten.

Die Tierversuche erfolgten nach dem bereits beschriebenen Zeitplan (vgl. Abbildung 16). Suszeptible CB6F1-Mäuse wurden im Abstand von 4 Wochen heterolog mit den entsprechenden Ad5- bzw. Ad5F35-Vektoren intramuskulär geimpft. 3 Wochen nach der zweiten Immunisierung erfolgte die Belastungsinfektion mit 2 500 SFFU FV.

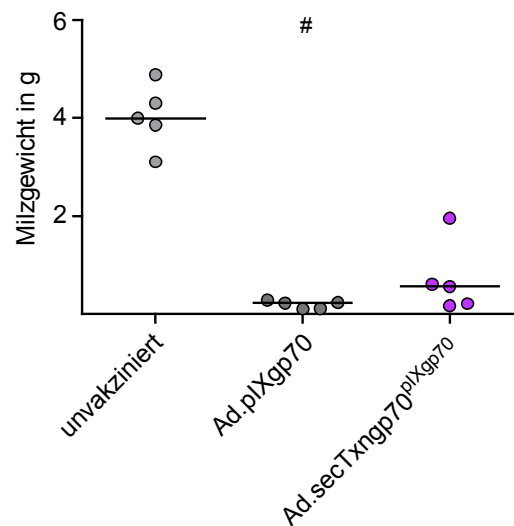


Abbildung 34: Milzgewichte nach Immunisierung mit Ad.secTxngp70pIXgp70

Die Versuchstiere wurden heterolog immunisiert und mit 2 500 SFFU FV infiziert. Drei Wochen nach Infektion wurden die Mäuse getötet und die Milzgewichte bestimmt. Jeder Punkt stellt eine individuelle Maus dar, Mediane sind durch waagerechte Linien und statistische Unterschiede gegenüber unvakzinierten Mäusen mit # gekennzeichnet, die Daten stammen aus einem Experiment.

Die ungeimpften Kontrolltiere entwickelten eine massive Splenomegalie, wohingegen die Impfung mit Ad.pIXgp70 zu einer signifikanten Reduktion der Milzgewichte gegenüber der ungeimpften Tiere führte (Abbildung 34). Nach der Immunisierung mit Ad.secTxngp70pIXgp70 und anschließender Infektion wurden in allen Tieren niedrigere Milzgewichte bestimmt als in ungeimpften Kontrolltieren, die Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.

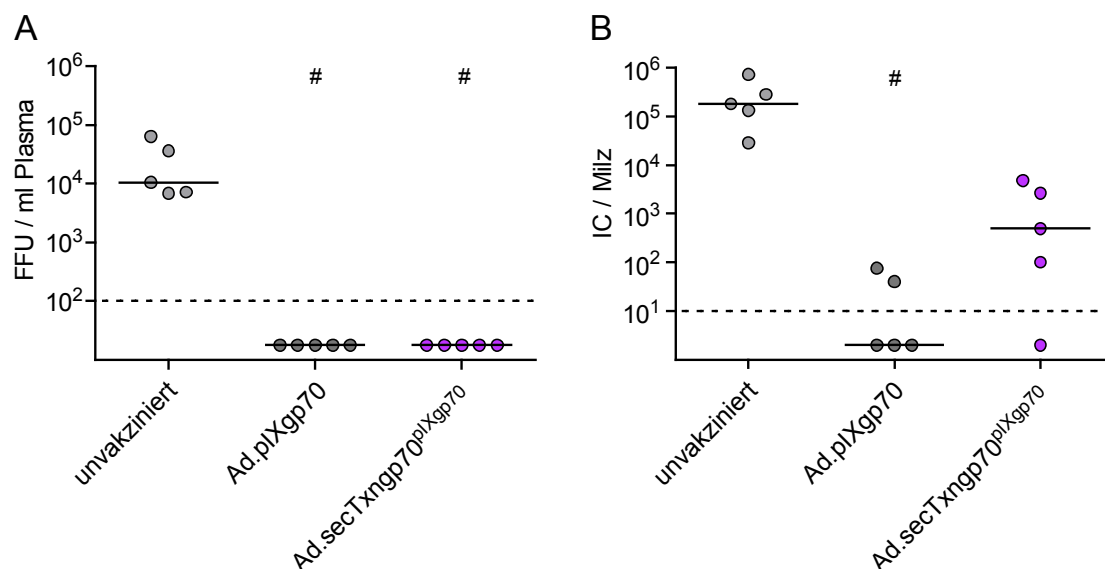


Abbildung 35: Viruslasten in Plasma und Milz nach Immunisierung mit Ad.secTxngp70pIXgp70

Freies Virus im Plasma (A) und die Viruslast in der Milz (B) wurden 10 bzw. 21 Tage nach Infektion analysiert. Jeder Punkt zeigt eine Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien und statistisch signifikante Unterschiede gegenüber unvakzinierten Mäusen mit # gekennzeichnet. Die Daten stammen aus einem Experiment.

Erneut wurden die Viruslasten im Plasma 10 Tage nach Infektion und in der Milz 21 Tage nach Infektion analysiert (Abbildung 35). Im Plasma war in allen immunisierten Tieren kein freies Virus detektierbar; die Plasmavirämie war somit signifikant verringert gegenüber unimmunisierten Mäusen. In der Milz konnten nach Immunisierung mit Ad.pIXgp70 nur in 2 von 5 Tieren virusinfizierte Zellen nachgewiesen werden; der Unterschied in der Viruslast war signifikant gegenüber ungeimpften Tieren. Die Immunisierung mit Ad.secTxngp70^{pIXgp70} führte zu einer Reduktion der Viruslast in der Milz im Vergleich zu ungeimpften Tieren, die allerdings nicht signifikant war; weiterhin lagen die Viruslasten von 4 mit Ad.secTxngp70^{pIXgp70} immunisierten Tieren höher als in den mit Ad.pIXgp70 geimpften Mäusen.

Zur Analyse der schutzvermittelnden Immunantworten wurden virusspezifische CD4⁺ T-Zellantworten 3 Tage nach Infektion mit 500 SFFU FV in der Milz bestimmt (Abbildung 36).

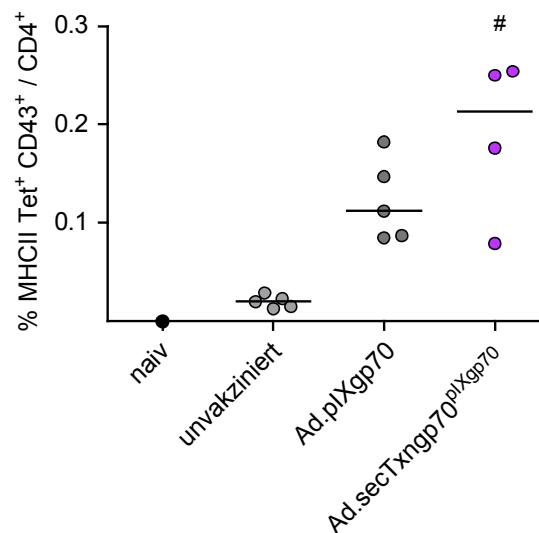


Abbildung 36: Virusspezifische CD4⁺ T-Zellantworten in der Milz

Heterolog immunisierte Mäuse wurden mit 500 SFFU FV infiziert. Nach 3 Tagen wurden virusspezifische CD4⁺ T-Zellantworten mittels der Tetramertechnologie in der Milz analysiert. Signifikante Unterschiede gegenüber ungeimpften Mäusen wurden mit # gekennzeichnet. Jeder Punkt entspricht einer Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien gekennzeichnet und die Daten stammen aus einem Experiment.

Virusspezifische CD4⁺ T-Zellantworten wurden durchflusszytometrisch mithilfe der Tetramertechnologie bestimmt. Die stärksten MHC II Tet⁺-Antworten aktivierter CD4⁺ T-Zellen wurden nach Immunisierung mit Ad.secTxngp70^{pIXgp70} detektiert. Diese waren signifikant höher im Vergleich zu ungeimpften Mäusen, zudem war eine Erhöhung gegenüber mit Ad.pIXgp70 geimpften Mäusen zu beobachten, die allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede erreichte.

Bindende Antikörper wurden zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung analysiert (Abbildung 37). Dabei konnten durch beide Vektoren keine hohen Titer nachgewiesen werden.

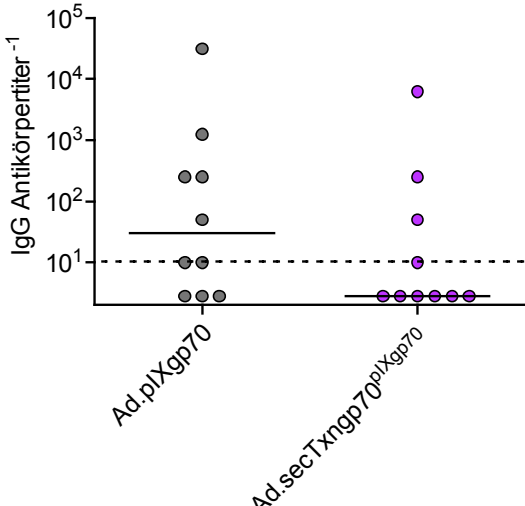


Abbildung 37: Bindende Antikörper nach der zweiten Immunisierung

Zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden bindende Antikörper im Serum analysiert. Jeder Punkt zeigt eine Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien gekennzeichnet, die Daten stammen aus einem Experiment.

Bei der Analyse von neutralisierenden Gesamt- und neutralisierenden IgG-Antikörperantworten (Abbildung 38) stellte sich heraus, dass die stärksten Antworten durch Impfung mit Ad.pIXgp70 induziert wurden. Auch in Tieren, die mit Ad.secTxngp70^{pIXgp70} geimpft wurden, konnten neutralisierende sowie neutralisierende IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Statistisch signifikante Unterschiede konnten jedoch nur zwischen ungeimpften und mit Ad.pIXgp70 immunisierten Tieren detektiert werden.

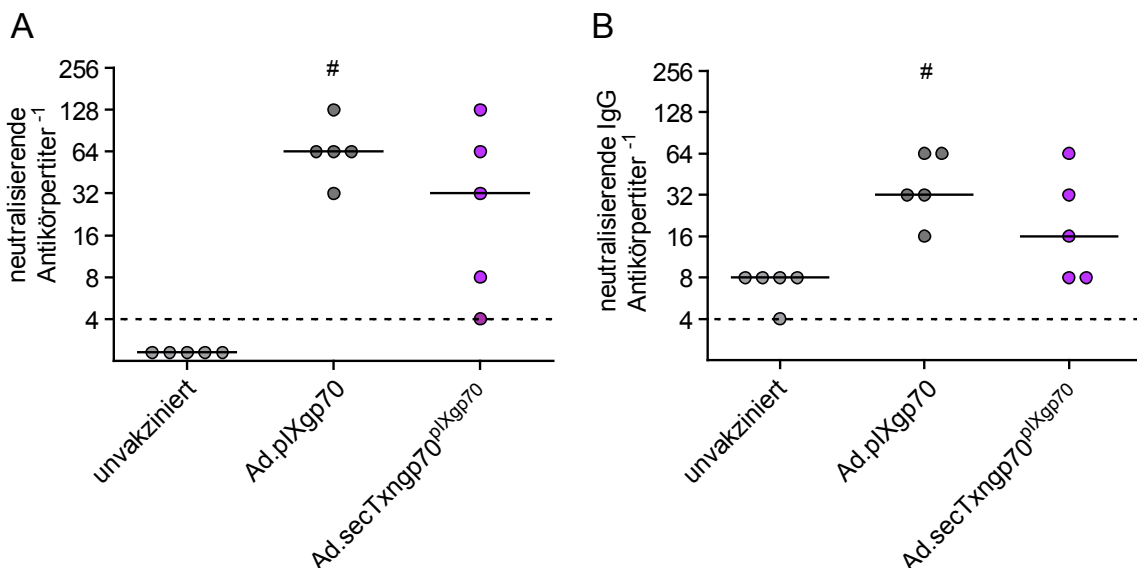


Abbildung 38: Gesamt neutralisierende und neutralisierende IgG-Antikörper nach Infektion

Die Versuchstiere wurden zwei Mal heterolog im Abstand von 4 Wochen immunisiert und nach weiteren 3 Wochen mit FV infiziert. Neutralisierende Antikörpertiter wurden 10 Tage nach Belastungsinfektion analysiert. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien und signifikante Unterschiede gegenüber unvakzinierten Tieren durch # gekennzeichnet, die Daten stammen aus einem Experiment.

Die Idee, die Eigenschaften der Vektoren Ad.pIXgp70 und Ad.secTxngp70 in einem Vektor zu kombinieren und so einen deutlich verbesserten Immunschutz zu erreichen, der mit neutralisierenden Antikörperantworten korrelierte, ist durch die Herstellung des Vektors Ad.secTxngp70^{pIXgp70} nicht gänzlich gelungen. Immunisierungen mit diesem Vektor führten zu nicht detektierbaren Viruslasten im Plasma und stärkeren virusspezifischen CD4⁺ T-Zellantworten im Vergleich zu Ad.pIXgp70 (Abbildung 36). Neutralisierende Antikörperantworten konnten durch diesen Vektor allerdings nicht verbessert werden (Abbildung 38), obwohl dies aus den vorangegangenen Experimenten, bei denen die beiden Vektoren Ad.pIXgp70 und Ad.secTxngp70 kombiniert appliziert wurden, erwartet wurde (Abbildung 33B).

5.2.5 Kombination aus Interleukin-adjuvantiertem Ad.pIXgp70 und CTL-induzierendem Vektor

Die prophylaktische Vakzinierung mit den Interleukin-kodierenden Vektoren Ad.IL5 und Ad.IL23 als Adjuvans in Kombination mit Ad.pIXgp70 führte zu einer deutlichen Verbesserung des Impfschutzes im Vergleich zur Immunisierung mit Ad.pIXgp70 allein (vgl. Kapitel 5.2.1). Zudem konnte in diesen Experimenten lediglich in einzelnen Mäusen eine Viruslast in den verwendeten Tests nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 18). Diese Tiere waren offensichtlich sehr gut geschützt; die Kombination aus Ad.pIXgp70 und den Interleukinvektoren induzierte dabei ausschließlich CD4⁺ T-Zellen sowie Antikörperantworten. In vorangegangenen Studien wurde allerdings gezeigt, dass ein vollständiger Impfschutz nur durch eine Vakzine erreicht werden kann, die neben CD4⁺ T-Zellen und neutralisierenden Antikörpern auch cytotoxische CD8⁺ T-Zellen induziert [28]. Dies wurde bisher nur durch ein lebend-attenuiertes N-tropes F-MuLV (F-MuLV-N) erreicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Kombination aus Ad.pIXgp70 und den Interleukinvektoren Ad.IL5 bzw. Ad.IL23 um eine Komponente erweitert, die starke CD8⁺ T-Zellantworten induziert. Hierzu wurde der adenovirale Vektor Ad.TxnGagL verwendet, der ein Fusionsprotein aus Thioredoxin und dem *leader* Gag-Epitop (Gag_{L85-93}) von F-MuLV kodiert. Der Impferfolg wurde mit dem des lebend-attenuierten F-MuLV-N verglichen.

Da die Kombination der Vektoren Ad.pIXgp70 und Ad.TxnGagL nur funktionierte, wenn zuerst mit der CTL-induzierenden Komponente immunisiert wurde (unpublizierte Beobachtung von Dr. W. Bayer), wurden für die Experimente suszeptible CB6F1-Mäuse zunächst ein Mal mit Ad5.TxnGagL, und nach 3 sowie weiteren 4 Wochen zweimal heterolog mit Ad.pIXgp70 in Kombination mit Ad.IL5 bzw. Ad.IL23 geimpft (Abbildung 39); die Impfungen mit den adenoviralen Vektoren erfolgten jeweils intramuskulär. Bei der letzten Immunisierung wurde eine weitere Gruppe mit 10 000 SFFU F-MuLV-N intravenös geimpft, sodass der erzielte Impferfolg der Adenovirus-basierten mit dem einer lebend-attenuierten Vakzine verglichen

werden konnte. Nach weiteren 3 Wochen erfolgte die Infektion mit 5 000 SFFU FV; die Infektionsdosis wurde im Vergleich zu den vorangegangenen Experimenten (2 500 SFFU) verdoppelt, um weiterhin Unterschiede im Schutz detektieren zu können (vgl. Kapitel 5.2.1).

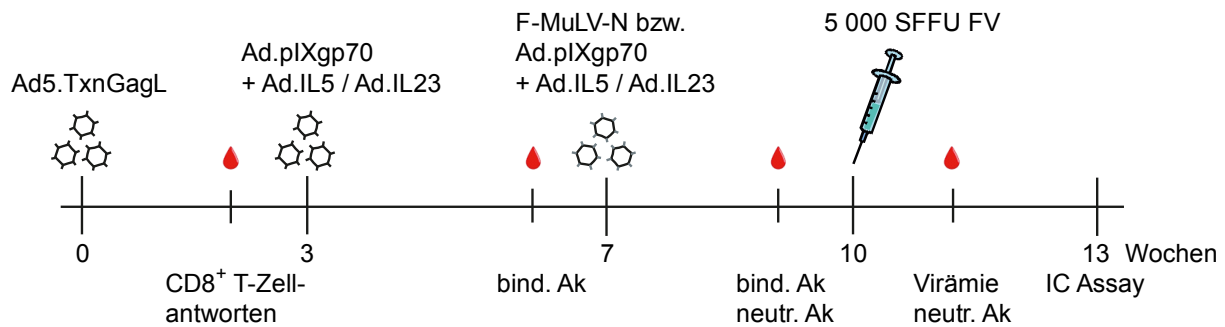


Abbildung 39: Zeitlicher Versuchsablauf zum Vergleich einer Adenovirus-basierten und lebend-attenuierten Vakzine im FV-Modell

Suszeptible CB6F1-Mäuse wurden zunächst mit Ad5.TxnGagL und anschließend zwei Mal heterolog mit Ad.pIXgp70 und Ad.IL5 bzw. Ad.IL23 intramuskulär geimpft. Bei der letzten Immunisierung wurde eine weitere Gruppe mit 10 000 SFFU F-MuLV-N geimpft. Nach drei Wochen wurden die Tiere mit 5 000 SFFU FV infiziert und Viruslasten in Plasma und Milz bestimmt. Zudem wurden humorale und zellvermittelte Immunantworten analysiert.

5.2.5.1 Schutz vor FV-Infektion

Zur Analyse des induzierten Schutzes der Vakzine auf die FV-Infektion wurde der Infektionsverlauf durch Palpation der Milzgröße zwei Mal pro Woche verfolgt und das Milzgewicht bestimmt (Abbildung 40).

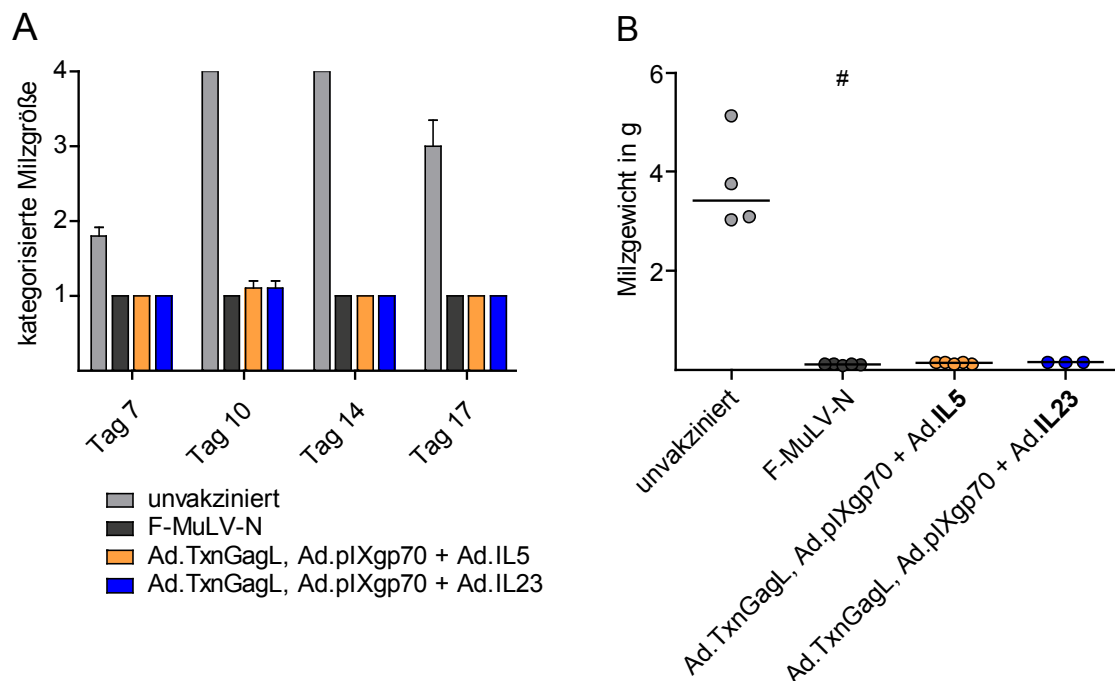


Abbildung 40: Milzgewichte und Kontrolle des Infektionsverlaufs mittels Palpation der Milzgrößen

Nach Infektion wurde der Infektionsverlauf durch Palpation der Milzgrößen zwei Mal pro Woche analysiert (A). Drei Wochen nach Infektion wurden die Milzen entnommen und gewogen (B). Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien gekennzeichnet.

Bei der Kontrolle der Milzgrößen durch Palpation zwei Mal pro Woche wurde in keinem immunisierten Tier eine vergrößerte Milz ertastet (Abbildung 40). Dies spiegelte sich bei der Analyse der Milzgewichte drei Wochen nach Infektion wider, bei der alle immunisierten Tiere niedrige Milzgewichte hatten, wohingegen die Infektion in unimmunisierten Tieren zu massiver Splenomegalie führte. Die Unterschiede im Milzgewicht waren allerdings nur zwischen ungeimpften und mit F-MuLV-N immunisierten Tieren statistisch signifikant.

Bei der Analyse der Viruslasten (Abbildung 41) zeigte sich, dass alle immunisierten Mäuse gut geschützt waren. Im Plasma war 10 Tage nach Infektion in keiner immunisierten Maus freies Virus nachweisbar; die Unterschiede zwischen den ungeimpften und immunisierten Tieren waren für alle drei Gruppen signifikant. In der Milz wurden nur geringe Viruslasten in einzelnen Mäusen nachgewiesen, allerdings führte lediglich die Immunisierung mit F-MuLV-N zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Viruslast im Vergleich zu ungeimpften Tieren.

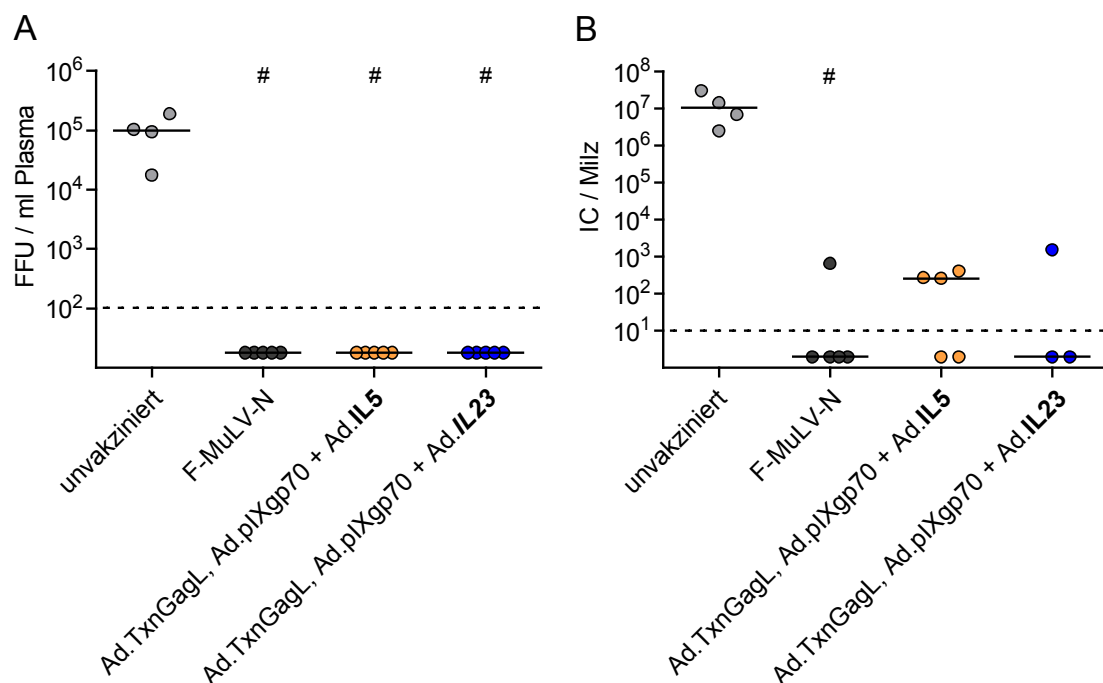


Abbildung 41: Viruslasten in Plasma und Milz

Zehn Tage nach Infektion wurden die Viruslasten im Plasma (A) und 21 Tage nach Infektion in der Milz (B) untersucht. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien und statistisch signifikante Unterschiede gegenüber ungeimpften Mäusen durch # gekennzeichnet. Die Daten stammen aus einem Experiment.

5.2.5.2 Analyse von Immunantworten auf die verabreichte Vakzine

Zur Überprüfung der Induktion cytotoxischer CD8⁺ T-Zellantworten erfolgte 2 Wochen nach der Immunisierung mit Ad5.TxnGagL eine Tetramer I- sowie intrazelluläre Cytokinfärbung aus dem Blut (Abbildung 42 und Abbildung 43).

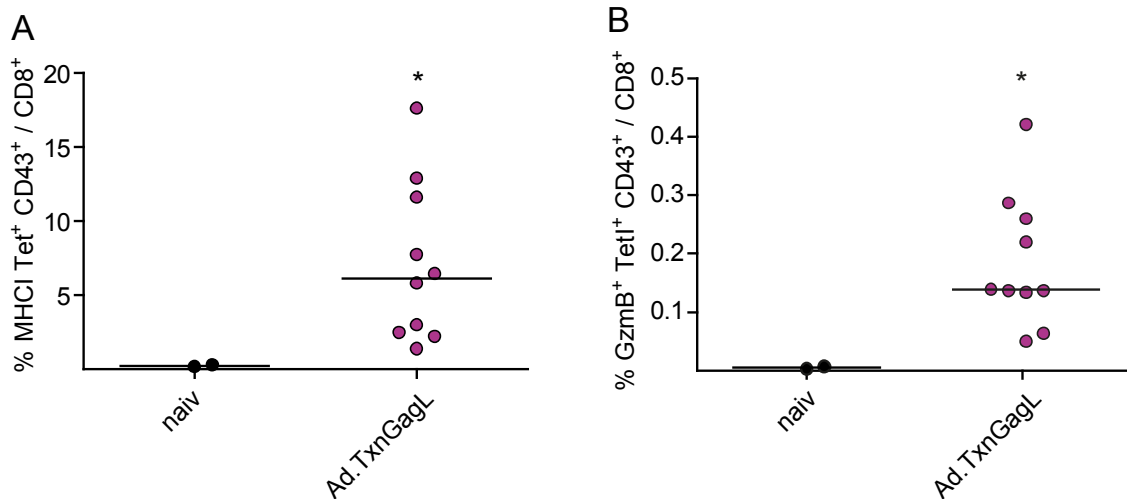


Abbildung 42: Tetramer I-Färbung nach der ersten Immunisierung

Zwei Wochen nach der ersten Immunisierung mit Ad5.TxnGagL wurden FV-spezifische CD8⁺ T-Zellantworten im Blut analysiert. Jeder Punkt stellt eine einzelne Maus dar, Mediane sind durch waagerechte Linien, statistisch signifikante Unterschiede mit * gekennzeichnet

Durch die einmalige Immunisierung mit Ad5.TxnGagL wurden signifikant höhere virusspezifische CD8⁺ T-Zellantworten nachgewiesen als in naiven Tieren (Abbildung 42A), die zusätzlich durch die Produktion von GzmB funktionell waren (Abbildung 42B); die Produktion von GzmB dient neben Tet I als Marker für die Aktivität und Funktionalität der CD8⁺ T-Zellen und war ebenfalls signifikant höher als in naiven Tieren. Zusätzlich wurde die Expression der intrazellulären Cytokine IFN γ und TNF α untersucht. Hierzu wurden die Blutzellen *ex vivo* mit dem FV GagL CD8-Peptid stimuliert, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 43).

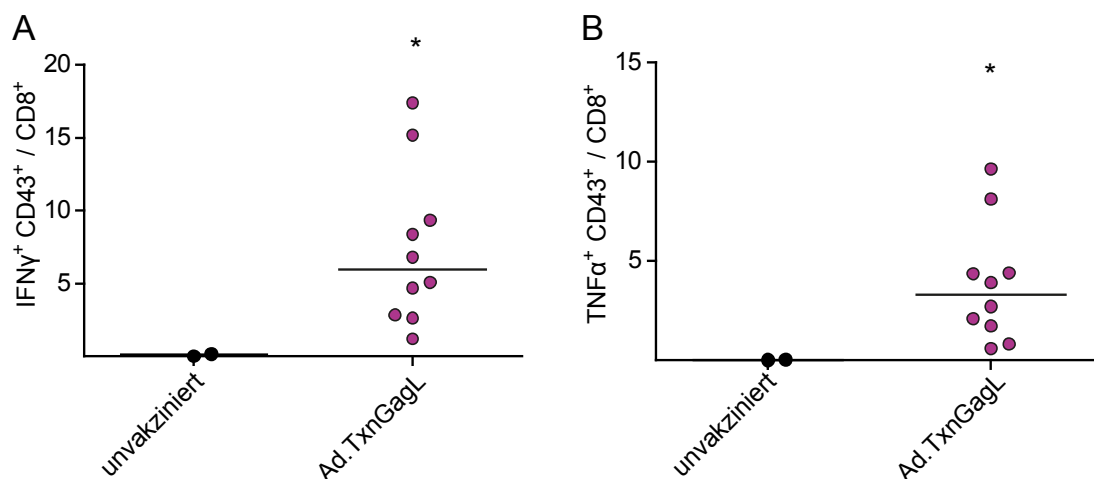


Abbildung 43: Analyse der intrazellulären Cytokine IFN γ und TNF α

Zwei Wochen nach der Immunisierung mit Ad5.TxnGagL erfolgte eine intrazelluläre Cytokinfärbung von IFN γ (A) und TNF α (B) aus dem Blut, wozu die Blutzellen zunächst sechs Stunden mit dem FV GagL CD8-Peptid stimuliert wurden. Jeder Punkt kennzeichnet eine individuelle Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien dargestellt, signifikante Unterschiede durch * gezeigt. Die Daten stammen aus einem Experiment.

Neben dem Anstieg virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen und der erhöhten Granzym B-Expression wurde nach der Immunisierung mit Ad5.TxnGagL auch eine signifikant gestiegene Produktion der Cytokine INF γ und TNF α im Vergleich zu ungeimpften Mäusen nachgewiesen (Abbildung 43). Nach der Peptidstimulation konnten ungefähr gleich viel INF γ -produzierende CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden wie Tet I⁺ T-Zellen (jeweils ~ 7 %). Die TNF α -Produktion hingegen war etwas geringer (~ 5 %). Somit war die Immunisierung mit Ad5.TxnGagL und der daraus resultierende Induktion cytotoxischer CD8⁺ T-Zellen erfolgreich.

Zusätzlich zu den cytotoxischen CD8⁺ T-Zellantworten wurden humorale Immunantworten ausgelöst durch die Kombination von Ad.pIXgp70 und den Interleukin-kodierenden Vektoren analysiert. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden bindende und neutralisierende Antikörper bestimmt (Abbildung 44), wo bereits ein erster Vergleich zwischen der Adenovirus-basierten und lebend-attenuierten Vakzine möglich war. Zudem wurden neutralisierende Antikörper sowie neutralisierende IgG-Antikörper 10 Tage nach der Belastungsinfektion analysiert (Abbildung 45).

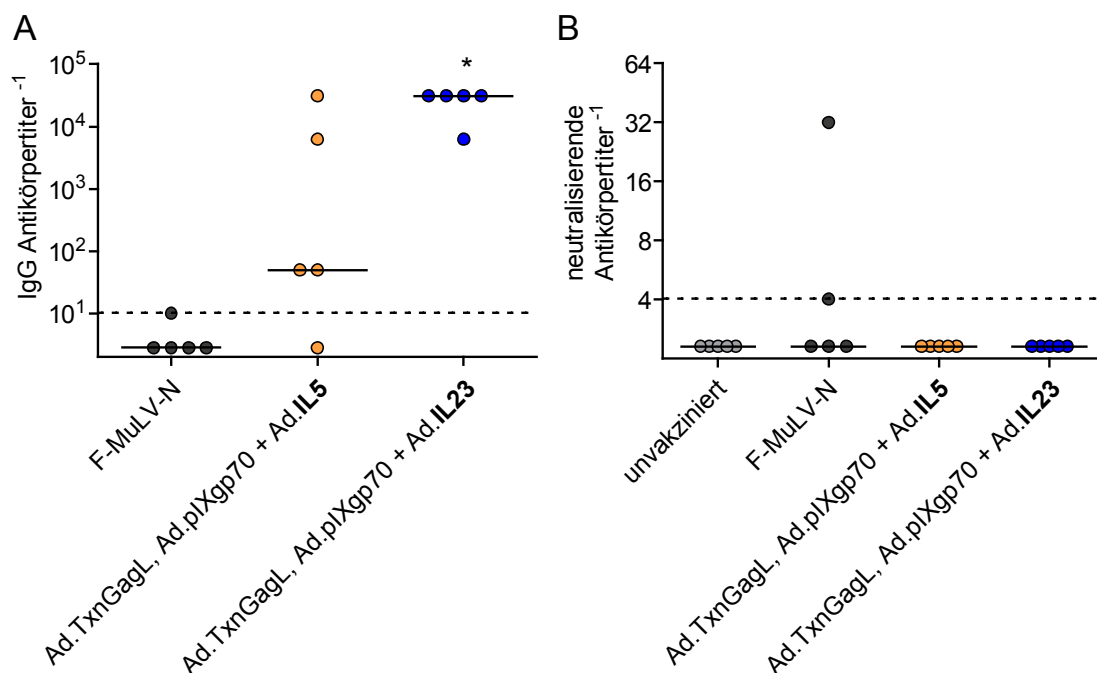


Abbildung 44: Antikörperantworten nach der letzten Immunisierung

Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden bindende (A) und neutralisierende (B) Antikörperantworten analysiert. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien und statistisch signifikante Unterschiede gegenüber mit F-MuLV-N immunisierten Tieren mit * gekennzeichnet. Die Daten stammen aus einem Experiment.

Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden bindende Antikörper nachgewiesen (Abbildung 44A). Dabei wurde festgestellt, dass die einmalige Immunisierung mit F-MuLV-N nur in einem Tier eine geringe bindende Antikörperantwort induzierte; hingegen wurden signifikant höhere Titer in mit Ad.IL23 koimmunisierten Mäusen nachgewiesen. Bei den neutralisierenden

Antikörpern nach Immunisierung wurden keine signifikanten Unterschiede detektiert. Während ungeimpfte und mit adenoviralen Vektoren immunisierte Tiere keine neutralisierenden Antikörper bildeten, konnten nach der Impfung mit F-MuLV-N in 2 von 5 Tieren neutralisierende Antikörperantworten nachgewiesen werden (Abbildung 44B).

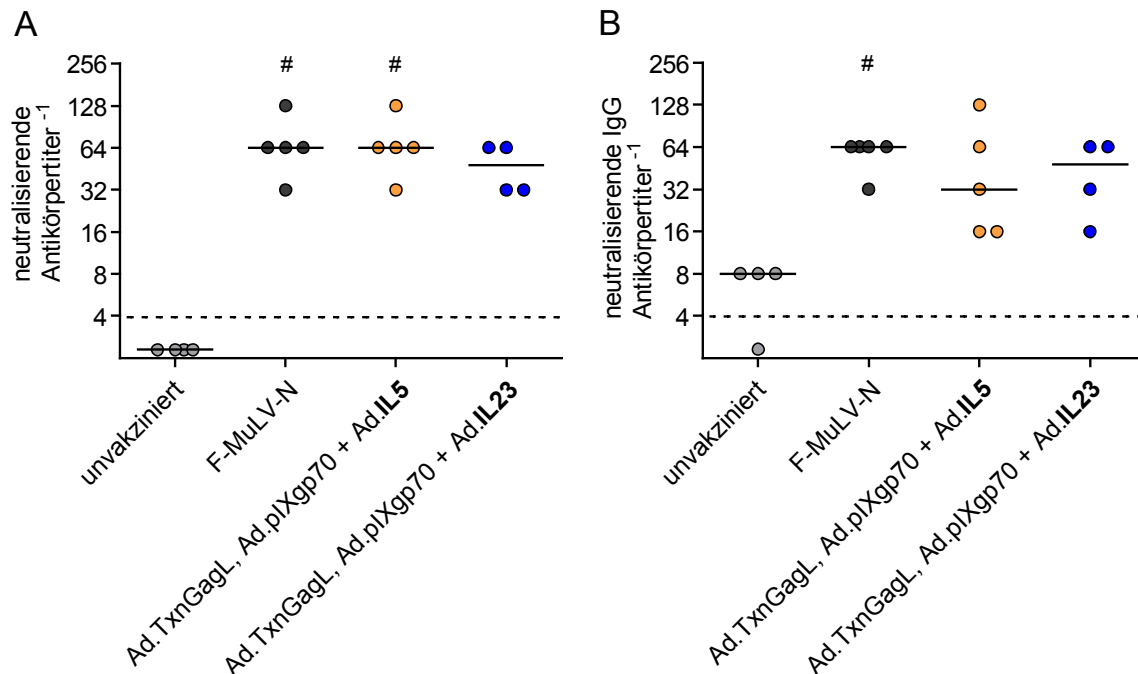


Abbildung 45: Neutralisierende und neutralisierende IgG-Antikörperantworten nach Belastungsinfektion

Zehn Tage nach Infektion wurden neutralisierende (A) sowie neutralisierende IgG-Antikörperantworten (B) untersucht. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien und signifikante Unterschiede gegenüber ungeimpften Mäusen mit # gekennzeichnet. Die Daten stammen aus einem Experiment.

Bei der Analyse neutralisierender Antikörperantworten 10 Tage nach FV-Infektion waren in allen Impfgruppen hohe neutralisierende Antikörpertiter zu detektieren, ungeimpfte Mäuse bildeten hingegen keine neutralisierenden Antikörper (Abbildung 45). Die Unterschiede in den Immunantworten zwischen ungeimpften und mit F-MuLV-N sowie mit Ad.IL5 koimmunisierten Tieren waren dabei statistisch signifikant. Bei der Bestimmung neutralisierender IgG-Antikörper waren leichte, allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den immunisierten Tieren messbar; die Impfung mit dem lebend-attenuierten F-MuLV-N führte zu den höchsten Titern, die im Vergleich zu ungeimpften Tieren signifikant höher waren.

Zusammenfassend führte die heterologe Impfung mit Ad.pIXgp70 und den Interleukinvektoren Ad.IL5 oder Ad.IL23 in Kombination mit dem CTL-induzierenden, adenoviralen Vektor Ad5.TxnGagL zu einem sehr guten Schutz vor der FV-Infektion. Trotz einer hohen Infektionsdosis von 5 000 SFFU FV entwickelte keines der Versuchstiere eine Splenomegalie und es waren nur in einzelnen Tieren niedrige Viruslasten in der Milz detektierbar. Bei der Analyse

der Immunantworten zeigten sich Unterschiede bei humoralen Immunantworten zwischen den mit adenoviralen Vektoren und mit lebend-attenuiertem Virus geimpften Tieren. Während die Impfung mit adenoviralen Vektoren nach Koimmunisierung mit Ad.IL23 starke bindende Antikörper induzierte, wurden diese Antworten bei Immunisierung mit lebend-attenuiertem F-MuLV-N nicht detektiert. Bei gesamten neutralisierenden Antikörpern waren keine Unterschiede feststellbar, allerdings führte die Immunisierung mit F-MuLV-N zu einem etwas schnelleren Klassenwechsel zu neutralisierenden IgG-Antikörpern 10 Tage nach Belastungsinfektion. Insgesamt war der durch die adenoviralen Vektoren vermittelte Schutz vergleichbar mit dem des lebend-attenuierten F-MuLV-N.

5.3 Therapeutische Immunisierungen im FV-Modell

Neben einer prophylaktischen anti-retroviralen Vakzine ist auch die Entwicklung einer Vakzine von großem Interesse, die therapeutisch einen positiven Einfluss auf den Verlauf einer chronischen Virusinfektion hat. Diesbezüglich wurden im Rahmen dieser Arbeit auch verschiedene Ansätze erprobt, mit denen sich die Viruslast in der chronischen FV-Infektion beeinflussen lässt. Bei diesen Experimenten handelte es sich allerdings ausschließlich um Pilotexperimente, bei denen mit einer geringen Tierzahl verschiedene Ansätze erprobt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede konnten somit aufgrund der geringen Gruppengröße nicht ermittelt werden, sodass lediglich Tendenzen herausgestellt werden können.

5.3.1 Kombination aus Ad5.pIXgp70 und Interleukin-kodierenden Vektoren

Zunächst wurde der therapeutische Effekt der Vakzine erprobt, die im Rahmen dieser Arbeit in prophylaktischen Immunisierungen den besten Impfschutz vermittelt hatte. Hierzu wurde die Kombination des Vektors Ad5.pIXgp70 mit dem Interleukinvektor Ad5.IL5 verwendet. Weiterhin wurde Ad5.env mit den adjuvanten Cytokinvektoren Ad5.CCL3 und Ad5.IFN α 4 eingesetzt, die sich in dieser Kombination in vorangegangenen prophylaktischen Studien ebenfalls als wirksam erwiesen hatten [7, 83].



Abbildung 46: Versuchsablauf der therapeutischen Impfung mit Ad5.pIXgp70 und Ad5.env

Für die therapeutische Vakzinierung mit Ad5.pIXgp70 und Ad5.env in Kombination mit den Cytokinen Ad5.IL5, Ad5.IFN α 4 bzw. Ad5.CCL3 wurden resistente C57BL/6-Mäuse mit einer Dosis von 15 000 SFFU FV chronisch infiziert und nach 5 Wochen mit den entsprechenden Vektoren geimpft. Nach einer Woche wurden Viruslasten und zellvermittelte Immunantworten analysiert.

Für die therapeutischen Experimente (Abbildung 46) wurden resistente C57BL/6-Mäuse mit einer Dosis von 15 000 SFFU FV chronisch infiziert und 5 Wochen nach der Infektion mit den entsprechenden Vektoren geimpft. Nach einer weiteren Woche wurden die Viruslasten in Milz und Lymphknoten sowie verschiedene zellvermittelte Immunantworten analysiert. Eine Woche nach der therapeutischen Impfung waren die Viruslasten in der Milz und den Lymphknoten der immunisierten Mäuse jeweils vergleichbar mit denen unvakzinierter Kontrolltiere (Abbildung 47).

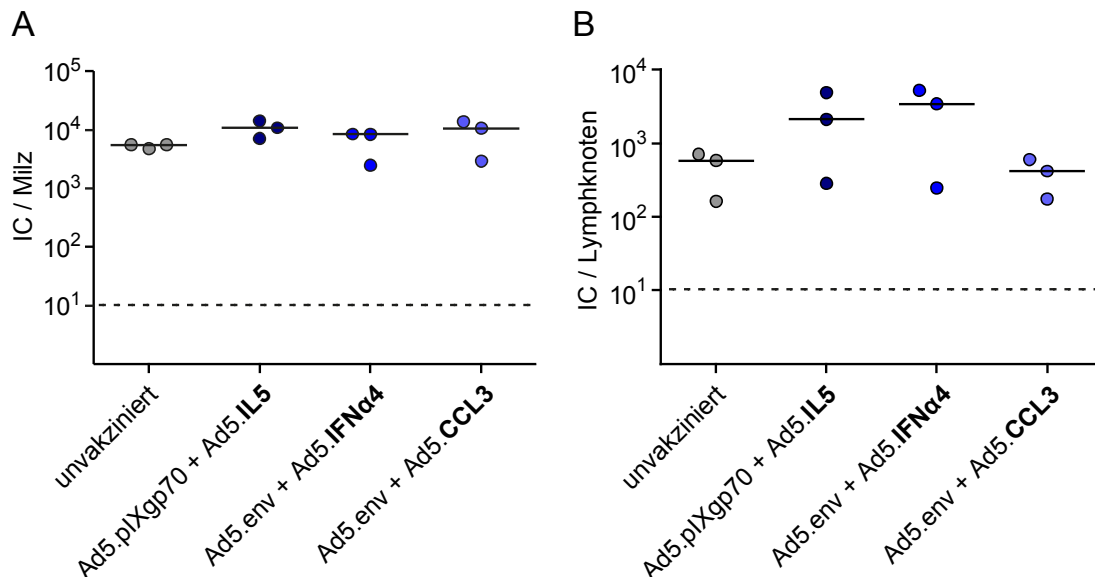


Abbildung 47: Viruslasten nach Immunisierung mit Ad5.pIXgp70 und Ad5.env

Die Viruslasten chronisch infizierter Mäuse wurden eine Woche nach therapeutischer Immunisierung mit Ad5.pIXgp70 und Ad5.IL5 sowie Ad5.env in Kombination mit Ad5.IFN α 4 und Ad5.CCL3 in Milzen (A) und Lymphknoten (B) analysiert. Jeder Punkt zeigt eine Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien gekennzeichnet und die Daten stammen aus einem Experiment.

Obwohl keine Unterschiede in den Viruslasten der immunisierten Mäuse zu beobachten waren (Abbildung 47), ließen sich Tendenzen in der Aktivität von CD8⁺ T-Zellen detektieren. Der prozentuale Anteil aktivierter und GzmB-exprimierender CD8⁺ T-Zellen war in allen immunisierten Mäusen höher als in den unvakzinierten Kontrolltieren (Abbildung 48A). Bei den CD4⁺ T-Zellantworten waren in der Milz keine Unterschiede zwischen den immunisierten und nicht-immunisierten, chronisch infizierten Tieren erkennbar (Abbildung 48B).

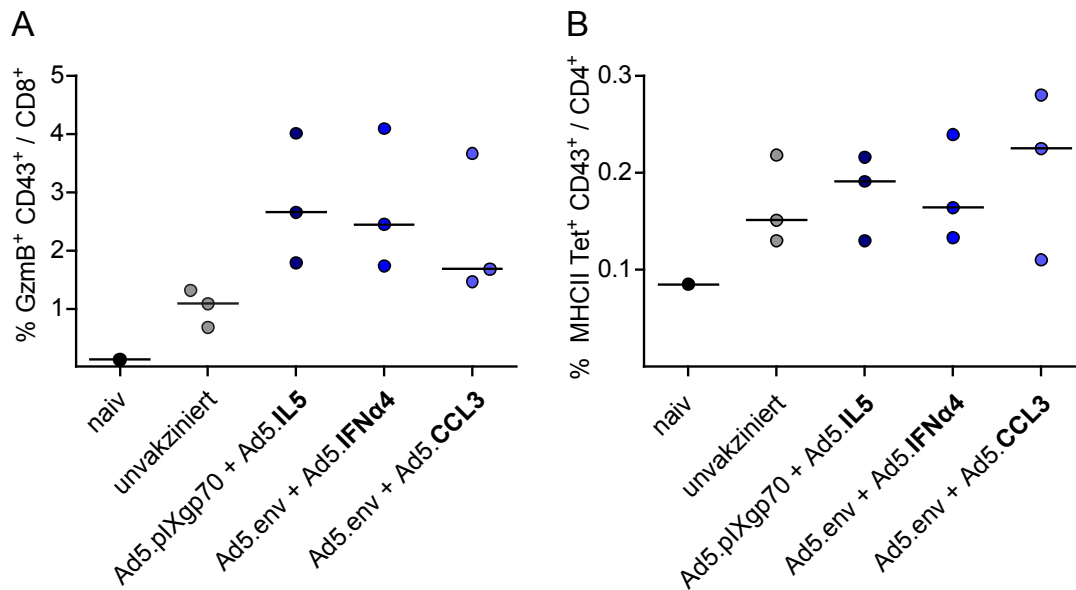


Abbildung 48: CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellantworten nach Impfung mit Ad5.pIXgp70 bzw. Ad5.env

Nach der therapeutischen Immunisierung chronisch infizierter Mäuse mit Ad5.pIXgp70 und Ad5.IL5 sowie Ad5.env und Ad5.IFNα4 bzw. Ad5.CCL3 wurden CD8⁺ (A) und CD4⁺ T-Zellantworten (B) in der Milz analysiert. Jeder Punkt kennzeichnet eine Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien gekennzeichnet und die Daten entstanden in einem Experiment.

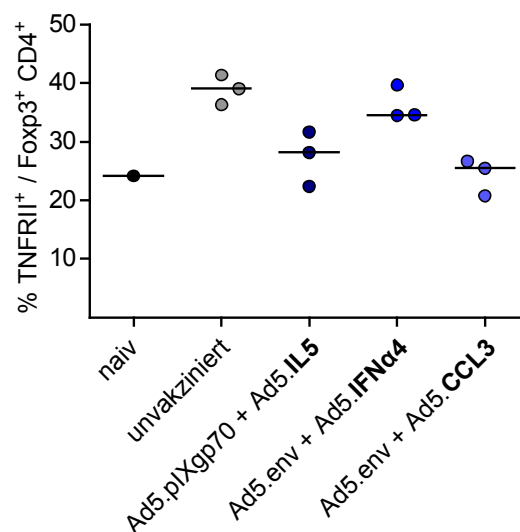


Abbildung 49: Regulatorische T-Zellantworten nach Impfung mit Ad5.pIXgp70 bzw. Ad5.env

Die Aktivierung regulatorischer T-Zellen wurde anhand des Aktivierungsmarkers TNFR11 in der Milz ermittelt. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien gekennzeichnet und die Daten stammen aus einem Experiment.

Weiterhin wurde die Aktivität von regulatorischen T-Zellen untersucht, die in der chronischen FV-Infektion eine bedeutende Rolle spielt (Abbildung 49). In der naiven Maus waren in der Milz etwa 25 % aktivierte regulatorische CD4⁺ T-Zellen detektierbar. In den chronisch infizierten, unbehandelten Mäusen wurden etwa 40 % aktivierte regulatorische T-Zellen nachgewiesen. Nach der therapeutischen Vakzinierung mit Ad5.pIXgp70 und Ad5.IL5 sowie der Kombination aus Ad5.env und Ad5.CCL3 lag die Aktivität der regulatorische T-Zellen bei etwa 25 - 32 %.

5.3.2 Verwendung der CTL-induzierenden Vakzine Ad5.TxnGagL

Da in der chronischen FV-Infektion cytotoxische CD8⁺ T-Zellen dysfunktional sind [157], ist bei einer therapeutischen Vakzinierung die Induktion von cytotoxischen CD8⁺ T-Zellen möglicherweise von besonderer Bedeutung, ohne die eine chronische Viruslast nicht gesenkt werden kann. Daher wurde im Folgenden der Vektor Ad5.TxnGagL als therapeutische Vakzine verwendet, der in prophylaktischen Impfungen durch die immunstimulatorische Wirkung des Thioredoxins starke CD8⁺ T-Zellantworten induzierte. In einem ersten Experiment in der chronischen FV-Infektion wurden nach der Impfung mit diesem Vektor keine reduzierten Viruslasten detektiert (Daten nicht gezeigt), sodass verschiedene Möglichkeiten verfolgt wurden, diesen Impfstoff weiter zu verbessern. Da sich bereits in der prophylaktischen Immunisierung verschiedene Cytokinvektoren zur Verbesserung des Impferfolgs eigneten, wurden auch bei der therapeutischen Impfung Cytokin-kodierende Vektoren herangezogen, um auf diese Weise das Immunsystem bereits vor der eigentlichen Impfung zu modulieren.

In unpublizierten Beobachtungen von Dr. W. Bayer stellte sich heraus, dass bei der Immunisierung mit Ad.pIXgp70 und Ad.TxnGagL keine CD8⁺ T-Zellantworten induziert wurden, wenn zunächst mit Ad.pIXgp70 geimpft worden war. Dies könnte durch eine gegen den adenoviralen Vektor gerichtete CD4⁺ T-Zellantwort bedingt sein. Folglich sollten in Immunisierungen unterschiedliche Effekte durch vorherige Stimulation mit den klassischen T_H1- und T_H2-Cytokinen IFN γ und IL4 zu beobachten sein. Gute CD8⁺ T-Zellantworten wären nach Immunisierung mit Ad5.IFN γ zu erwarten, wohingegen Ad5.IL4 eine T_H2-Polarisierung bedingt, wodurch schwächere cytotoxische Antworten zu erwarten sind. Allerdings stellte sich bei diesen prophylaktischen Experimenten heraus, dass mehr aktivierte CD8⁺ T-Zellen nach Präimmunisierung mit Ad5.IL4 vorlagen (unpublizierte Beobachtung von Dr. W. Bayer).

5.3.2.1 Präimmunisierung mit Ad5.IL4

Zunächst erfolgte die Modulation des Immunsystems durch den Interleukinvektor Ad5.IL4. Da das Cytokin IL4 der Hauptwachstumsfaktor von T_H2-Zellen ist, sollten durch die Vorimmunisierung CD4⁺ T-Zellen gegen den adenoviralen Vektor induziert werden, die dann kreuzreaktiv die FV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort durch Ad5.TxnGagL unterstützen sollte.

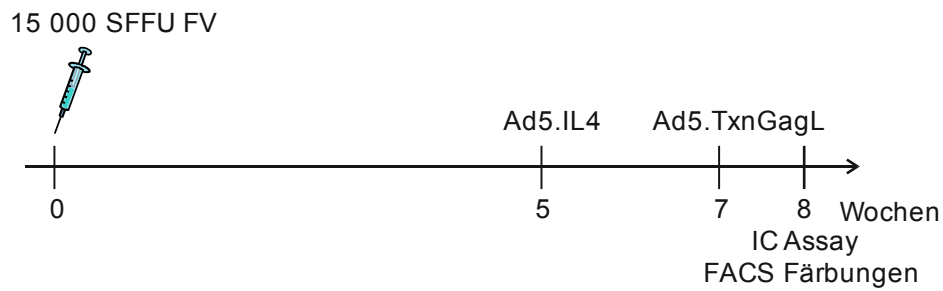


Abbildung 50: Zeitlicher Ablauf der therapeutischen Präimmunisierung mit Ad5.IL4

Resistente C57BL/6-Mäuse wurden mit einer Dosis von 15 000 SFFU FV infiziert. Fünf Wochen nach der Infektion wurden die Tiere mit Ad5.IL4 präimmunisiert und nach weiteren zwei Wochen mit Ad5.TxnGagL geimpft. Eine Woche später wurden die Viruslasten in Milz und Lymphknoten bestimmt sowie verschiedene Immunantworten durchflusszytometrisch analysiert.

Nach der Ausbildung einer chronischen FV-Infektion in resistenten C57BL/6 Mäusen wurden die Tiere zunächst mit Ad5.IL4 vorimmunisiert und 2 Wochen später mit Ad5.TxnGagL geimpft. Eine Woche nach der zweiten Impfung wurden die Viruslasten in der Milz und den Lymphknoten bestimmt, zudem wurden verschiedene Immunantworten durchflusszytometrisch analysiert.

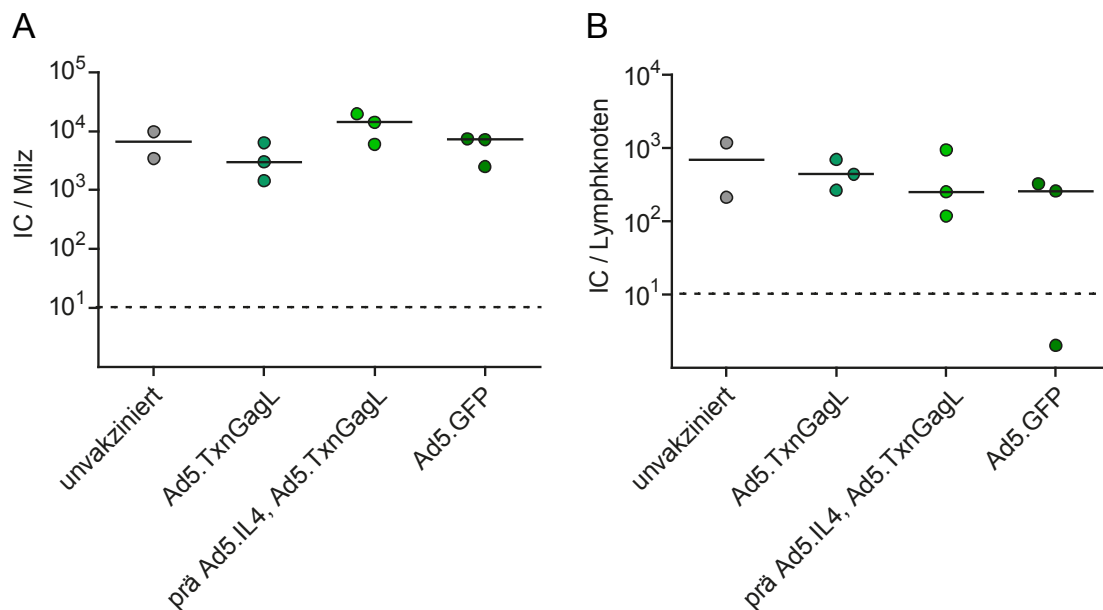


Abbildung 51: Viruslasten in mit Ad5.IL4 präimmunisierten Mäusen

Eine Woche nach Immunisierung mit Ad5.TxnGagL wurden die Viruslasten in Milz (A) und Lymphknoten (B) analysiert. Als Kontrollen dienten unvakzinierte sowie mit einem GFP-kodierenden adenoviralen Vektor immunisierte Mäuse. Weiterhin wurden Mäuse mit Ad5.TxnGagL immunisiert sowie präimmunisiert mit Ad5.IL4. Jeder Punkt kennzeichnet eine Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien dargestellt und die Daten stammen aus einem Experiment.

Die Viruslasten in der Milz chronisch infizierter Mäuse waren nach Immunisierung mit Ad5.TxnGagL sowie Präimmunisierung mit Ad5.IL4 und anschließender Impfung mit Ad5.TxnGagL vergleichbar mit denen der Kontrollgruppen. Auch bei den Viruslasten in den Lymphknoten wurden keine Unterschiede detektiert (Abbildung 51).

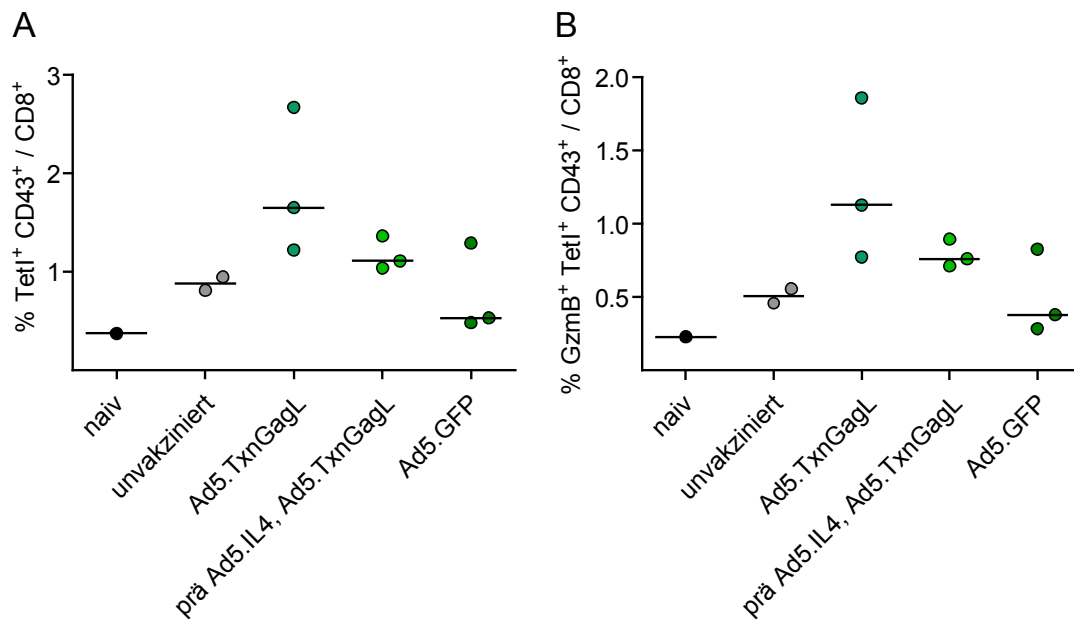


Abbildung 52: Cytotoxische CD8⁺ T-Zellantworten nach Präimmunisierung mit Ad5.IL4

Eine Woche nach der Immunisierung mit Ad5.TxnGagL wurden cytotoxische CD8⁺ T-Zellantworten in der Milz analysiert. Jeder Punkt kennzeichnet eine Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien dargestellt und die Daten entstammen einem Experiment.

In mit Ad5.TxnGagL immunisierten, chronisch infizierten Tieren zeigte sich eine Tendenz zu einem prozentual höheren Anteil aktivierter, virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen als in den ungeimpften Kontrolltieren (Abbildung 52A) und zudem war in dieser Gruppe auch die GzmB-Expression dieser Zellen höher (Abbildung 52B). Durch die Präimmunisierung mit Ad5.IL4 wurde keine weitere Erhöhung dieser Antworten detektiert.

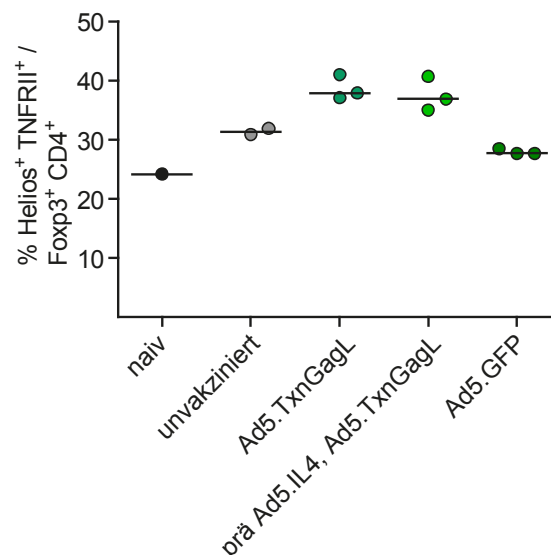


Abbildung 53: Analyse regulatorischer T-Zellen in Ad5.IL4-präimmunisierten Mäusen

Die Aktivierung regulatorischer T-Zellen wurde eine Woche nach Immunisierung mit Ad5.TxnGagL in der Milz untersucht und durch die Aktivierungsmarker Helios und TNFR11 dargestellt. Jeder Punkt kennzeichnet eine individuelle Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien dargestellt und die Daten entstanden in einem Experiment.

Bei der Analyse regulatorischer T-Zellen (Abbildung 53) in therapeutisch immunisierten Mäusen fiel auf, dass in den Mausgruppen, die mit Ad5.TxnGagL geimpft oder zuvor mit Ad5.IL4 präimmunisiert wurden, mehr aktivierte regulatorische T-Zellen im Vergleich zu ungeimpften Tieren nachgewiesen wurden.

5.3.2.2 Präimmunisierung mit Ad5.IFN γ

Neben der immunmodulatorischen Wirkung des T_H2-Cytokins IL4 wurde auch die Präimmunisierung mit dem T_H1-Cytokin IFN γ untersucht. Das proinflammatorische Cytokin IFN γ sollte dabei die cytotoxische CD8⁺ T-Zellantwort, die durch Ad5.TxnGagL induziert wird, weiter verstärken. Der Versuchsablauf erfolgte dabei analog zu dem vorangegangenen Experiment; chronisch infizierte C57BL/6-Mäuse wurden fünf Wochen nach der Infektion mit Ad5.IFN γ prä- und nach weiteren 2 Wochen mit Ad5.TxnGagL immunisiert (Abbildung 54).

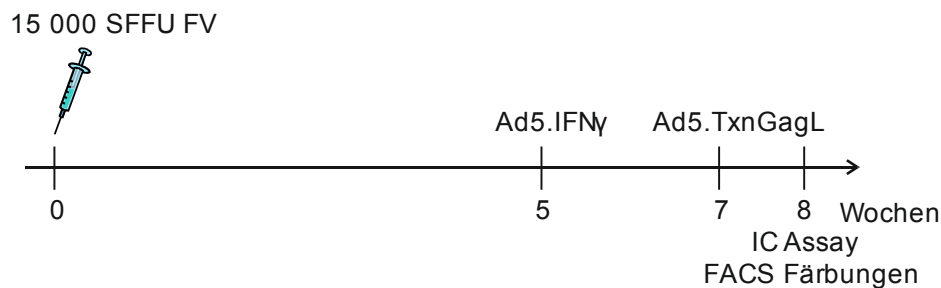


Abbildung 54: Zeitlicher Versuchsablauf der Präimmunisierung mit Ad5.IFN γ

Resistente C57BL/6-Mäuse wurden mit einer Dosis von 15 000 SFFU FV chronisch infiziert. Nach fünf Wochen erfolgte die Präimmunisierung mit Ad5.IFN γ und nach zwei Wochen die Immunisierung mit Ad5.TxnGagL. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden die Viruslasten und zellvermittelte Immunantworten analysiert.

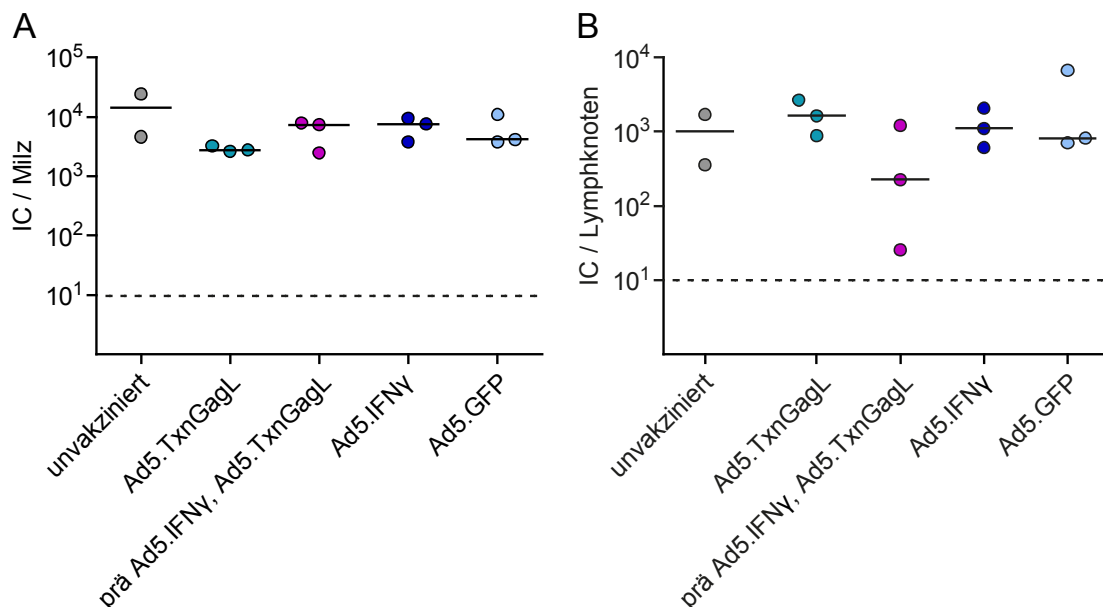


Abbildung 55: Viruslasten in Milz und Lymphknoten nach Präimmunisierung mit Ad5.IFN γ

Viruslasten in Milz (A) und Lymphknoten (B) wurden eine Woche nach der Immunisierung mit Ad5.TxnGagL analysiert. Jeder Punkt zeigt eine einzelne Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien gekennzeichnet und die Daten stammen aus einem Experiment.

Auch hier wurden zunächst die Viruslasten eine Woche nach Immunisierung mit Ad5.TxnGagL in Milz und Lymphknoten analysiert. Bei den Viruslasten in der Milz waren keine Unterschiede detektierbar (Abbildung 55A). In den Lymphknoten waren hingegen nach Präimmunisierung mit Ad5.IFN γ und anschließender Impfung mit Ad5.TxnGagL die Viruslasten in 2 von 3 Tieren niedriger als in den unvakzinierten Kontrolltieren (Abbildung 55B). In den anderen immunisierten Gruppen wurden keine Unterschiede zu den ungeimpften Kontrolltieren festgestellt.

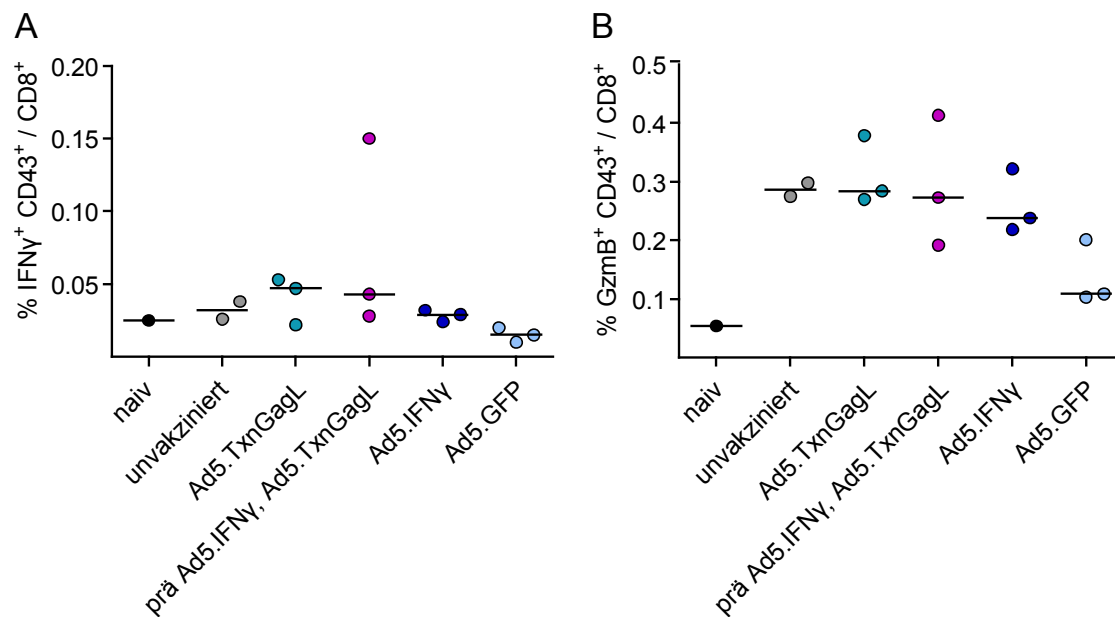


Abbildung 56: CD8⁺ T-Zellantworten in Lymphknoten nach Präimmunisierung mit Ad5.IFN γ

Die CD8⁺ T-Zellantworten sind nach spezifischer Stimulation mit dem FV GagL CD8-Peptid in den Lymphknoten dargestellt. Jeder Punkt zeigt eine Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien dargestellt und die Daten stammen aus einem Experiment.

Um insbesondere den Effekt der Präimmunisierung mit IFN γ und die daraus resultierende reduzierte Viruslast in 2 von 3 Tieren in den Lymphknoten weiter zu analysieren, wurden die CD8⁺ T-Zellantworten in den Lymphknoten untersucht (Abbildung 56). Dabei war nach Stimulation mit dem FV GagL CD8-Peptid im Vergleich zu unvakzinierten Kontrolltieren keine erhöhte IFN γ - oder GzmB-Expression aktivierter cytotoxischer T-Zellen detektierbar.

Bei der Analyse aktivierter regulatorischer T-Zellen in den Lymphknoten wurde in 2 von 3 mit Ad5.TxnGagL geimpften Tieren eine höhere Aktivierung regulatorischer T-Zellen im Vergleich zu ungeimpften, chronisch infizierten Kontrolltieren (Abbildung 57) detektiert. In den mit Ad5.IFN γ präimmunisierten und anschließend mit Ad5.TxnGagL geimpften Tieren wurden hingegen in 2 von 3 Tieren niedrigere Aktivitäten der regulatorischen T-Zellen im Vergleich zur ungeimpften, chronisch infizierten Kontrollgruppe gemessen.

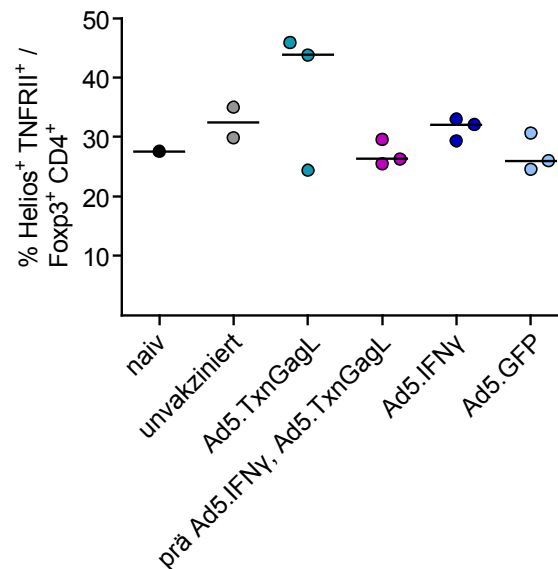


Abbildung 57: Aktivität regulatorischer T-Zellen nach Präimmunisierung mit Ad5.IFNy

Die durchflusszytometrische Analyse von regulatorischen T-Zellen in den Lymphknoten erfolgte eine Woche nach Immunisierung mit Ad5.TxnGagL. Jeder Punkt zeigt eine einzelne Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien gekennzeichnet und die Daten stammen aus einem Experiment.

5.3.2.3 Präimmunisierung mit Ad5.IL23

In Bezug auf die vorangegangenen Beobachtungen, dass in den immunisierten Tieren teilweise eine höhere Aktivierung regulatorischer T-Zellen detektiert wurde, wurde die immunmodulatorische Wirkung von Ad5.IL23 zur Präimmunisierung untersucht. Im Gegensatz zu den Cytokinen IL4 und IFN γ , die an der Polarisierung von T_H2- bzw. T_H1-Antworten beteiligt sind, kontrolliert das proinflammatorische Cytokin IL23 unter anderem die Induktion regulatorischer T-Zellen [66].

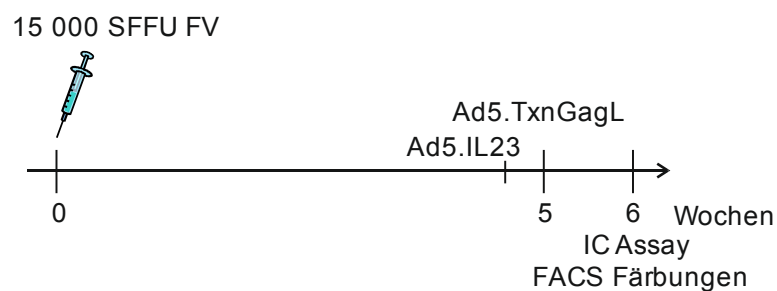


Abbildung 58: Versuchsablauf der Präimmunisierung mit Ad5.IL23

Resistente C57BL/6-Mäuse wurden mit 15 000 SFFU FV infiziert und nach fünf Wochen therapeutisch mit Ad5.TxnGagL geimpft. Die Präimmunisierung mit Ad5.IL23 erfolgte zwei Tage zuvor. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden die Viruslasten und zellvermittelten Immunantworten analysiert.

Die Präimmunisierung mit Ad5.IL23 erfolgte 2 Tage vor der Immunisierung mit Ad5.TxnGagL; der Abstand der Immunisierung wurde verkürzt, damit IL23 zum Zeitpunkt der Impfung mit Ad5.TxnGagL aktiv exprimiert wird und somit direkt Einfluss auf eine mögliche regulatorische T-Zellinduktion haben kann. Zudem wurde die Kombination beider Vektoren zu einem

Impfzeitpunkt untersucht. Die Analyse der Viruslasten sowie zellvermittelten Immunantworten erfolgte erneut eine Woche nach der letzten Immunisierung.

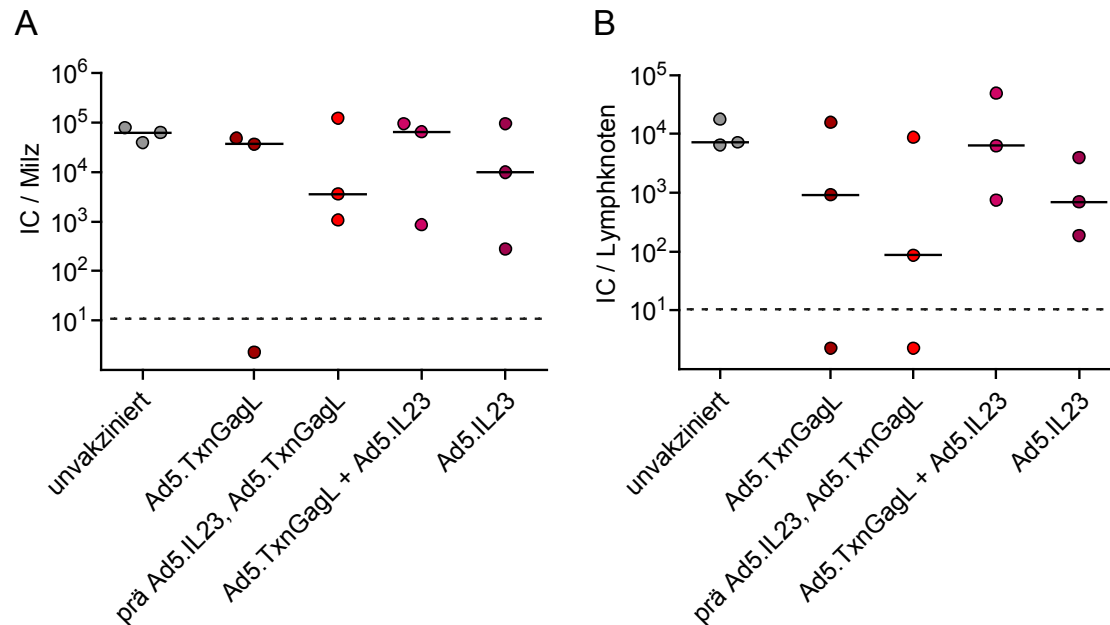


Abbildung 59: Viruslasten in Milz und Lymphknoten nach Präimmunisierung mit Ad5.IL23

Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden die Viruslasten in Milz (A) und Lymphknoten (B) analysiert. Jeder Punkt zeigt eine individuelle Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien dargestellt und die Daten stammen aus einem Experiment.

In diesem Experiment wurden im Vergleich zu den vorangegangenen therapeutischen Immunisierungen die stärksten Effekte auf die Viruslast in Milz und Lymphknoten beobachtet. Die Präimmunisierung mit Ad5.IL23 und anschließende Immunisierung mit Ad5.TxnGagL nach zwei Tagen führte sowohl in der Milz als auch in den Lymphknoten in 2 von 3 Tieren zu einer niedrigeren Viruslast im Vergleich zu ungeimpften Kontrolltieren (Abbildung 59). Bei der kombinierten Immunisierung mit Ad5.IL23 und Ad5.TxnGagL zu einem Zeitpunkt waren die Viruslasten in der Milz und Lymphknoten in jeweils nur einem Tier niedriger als in der Kontrollgruppe.

Bei der Untersuchung cytotoxischer CD8⁺ T-Zellantworten wurden die Expression von IFN γ und GzmB nach unspezifischer Stimulation in den Lymphknoten analysiert (Abbildung 60). Nach der Immunisierung mit Ad5.TxnGagL und Ad5.IL23 zu einem Impfzeitpunkt wurde in den Lymphknoten in 2 von 3 Tieren eine stärkere IFN γ -Produktion im Vergleich zu ungeimpften, chronisch infizierten Kontrolltieren gemessen (Abbildung 60A). Durch die Präimmunisierung mit Ad5.IL23 waren keine Unterschiede bei der Analyse von IFN γ feststellbar. Hingegen führte die Präimmunisierung mit Ad5.IL23 in allen drei Tieren zu einer höheren GzmB-Expression als in ungeimpften Tieren (Abbildung 60B); hier waren durch die kombinierte Immunisierung mit beiden Vektoren keine Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe feststellbar.

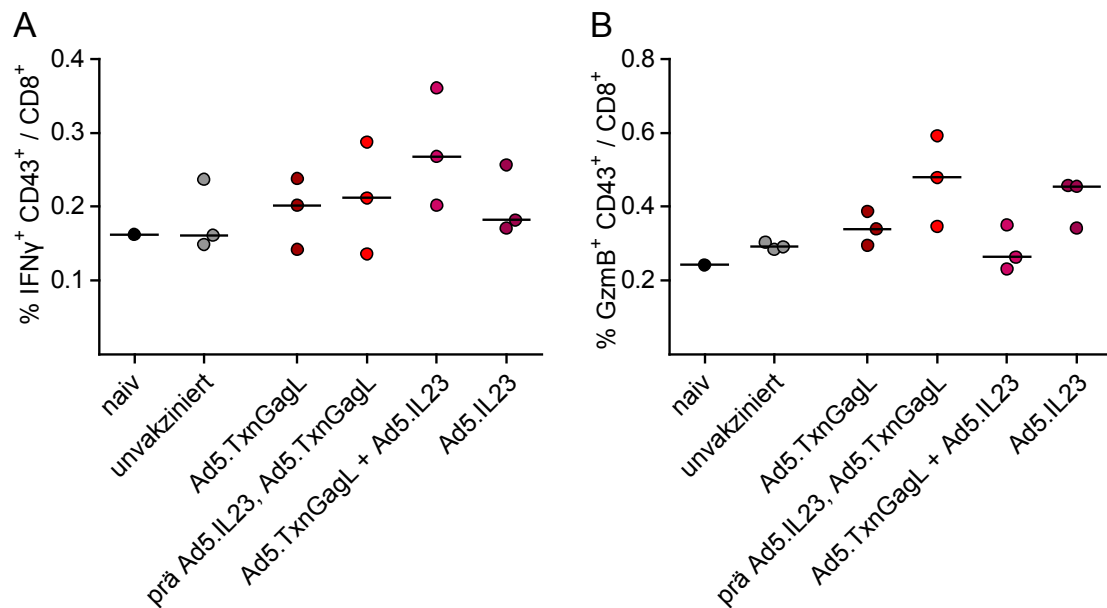


Abbildung 60: Cytokinproduktion nach Präimmunisierung mit Ad5.IL23

Nach unspezifischer Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 wurden IFN γ - (A) und GzmB-produzierende CD8⁺ T-Zellen (B) in den Lymphknoten analysiert. Jeder Punkt zeigt eine einzelne Maus, waagerechte Linien stellen Mediane dar und die Daten stammen aus einem Experiment.

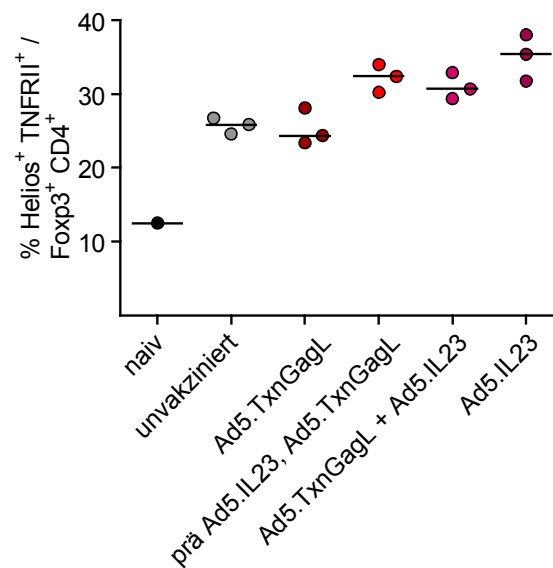


Abbildung 61: Regulatorische T-Zellantworten nach Präimmunisierung mit Ad5.IL23

Eine Woche nach Immunisierung mit Ad5.TxnGagL wurden regulatorische T-Zellantworten in den Lymphknoten analysiert. Jeder Punkt zeigt eine Maus, Mediane sind durch waagerechte Linien gekennzeichnet und die Daten stammen aus einem Experiment.

Bei der Untersuchung der Aktivierung regulatorischer T-Zellen (Abbildung 61) in den Lymphknoten zeigte sich sowohl in allen präimmunisierten als auch gleichzeitig mit Ad5.IL23 geimpften Tieren eine Tendenz zu höheren Aktivitäten regulatorischer T-Zellen im Vergleich zu ungeimpften, chronisch infizierten Kontrolltieren.

6 Diskussion

Die HIV/AIDS-Epidemie ist weltweit, insbesondere in Entwicklungsländern, eines der größten Gesundheitsprobleme der heutigen Zeit. Bis heute konnte trotz intensiver Forschung keine schützende Vakzine entwickelt werden. Die hochaktive anti-retrovirale Therapie (HAART, highly active anti-retroviral therapy) führt zwar in behandelten Patienten über lange Zeit zu reduzierten Viruslasten, allerdings kann durch diese Therapie keine vollständige Eliminierung der Virusinfektion erfolgen. Daher ist in der Bekämpfung der HIV-Infektion die Entwicklung einer schützenden und gleichzeitig sicheren Vakzine von entscheidender Bedeutung. Vorangegangene Studien in verschiedenen Tiermodellen sowie Ergebnisse klinischer Studien gegen HIV zeigten, dass eine schützende anti-retrovirale Vakzine vielseitige Immunantworten induzieren muss, die humorale sowie zellvermittelte Antworten einschließen [17, 28, 86, 113]. Allerdings ist dabei insbesondere die Induktion starker neutralisierender Antikörperantworten durch eine sichere Vakzine eine herausfordernde Aufgabe.

Für die Impfstoffentwicklung wurden adenovirale Vektoren bereits in zahlreichen Infektionen eingesetzt. Vorteilhaft ist dabei die relativ große Transgenkapazität der Vektoren, außerdem transduzieren sie verschiedene Zelltypen effizient und sind zusätzlich leicht in großen Mengen herstellbar [153]. Diese Vektoren sind auch bereits in klinischen Studien für die Entwicklung eines HIV-Impfstoffs eingesetzt worden. In der STEP-Studie, in der jedoch nur Vektoren verwendet wurden, die zelluläre Immunantworten induzierten, erwiesen sie sich zum Schutz vor einer HIV-Infektion als unwirksam [17].

Erschwert wird die Entwicklung zusätzlich durch das Fehlen eines geeigneten Kleintiermodells. Es stehen zwar verschiedene Affenmodelle zur Verfügung, dabei sind aber die Heterogenität sowie die begrenzte Anzahl zur Verfügung stehender Tiere problematisch. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher das murine FV-Modell verwendet, in dem durch die Verwendung vieler genetisch identischer Versuchstiere verschiedene Impfstoffe direkt miteinander verglichen werden können. Zusätzlich ermöglicht die Suszeptibilität verschiedener Mausstämme gegenüber der FV-Infektion sowohl die Etablierung prophylaktischer als auch therapeutischer Vakzinen. In diesem Modell ist die Verwendung adenoviraler Vektoren als Impfvektoren bereits etabliert.

6.1 Prophylaktische Vakzinierung

In der FV-Infektion vermittelte die Impfung mit einem Adenovirus-basierten Env gp70 *expression/display*-Vektor Ad.pIXgp70 einen guten Schutz vor der FV-Infektion, der mit starken FV-spezifischen CD4⁺ T-Zell- und bindenden Antikörperantworten korrelierte [6], allerdings konnten neutralisierende Antikörper erst nach FV-Infektion nachgewiesen werden. Nun wurde im Rahmen dieser Arbeit die Verbesserung der Impfung mit diesem Vektor in Bezug auf die

Induktion neutralisierender Antikörper fokussiert. Hierzu wurden zunächst adenovirale Vektoren, die die Interleukine IL4, IL5, IL6, IL7 oder IL23 kodierten, als genetisches Adjuvans eingesetzt. Die stärksten Effekte wurden dabei durch die kombinierte Impfung mit Ad.pIXgp70 und den Interleukin-kodierenden Vektoren Ad.IL5 und Ad.IL23 erzielt. Die Koimmunisierung mit diesen Vektoren führte dabei zu einem signifikanten Anstieg neutralisierender Antikörper nach FV-Infektion, die vermutlich den verbesserten Schutz vermitteln. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist für IL5 naheliegend. IL5 wirkt auf aktivierte B-Zellen, indem es die terminale Differenzierung in Antikörper-produzierende Plasmazellen induziert und zudem die Antikörperproduktion stimuliert [79]. IL23 ist hingegen wichtig für das Überleben und die Funktion von T-Gedächtniszellen sowie als Überlebensfaktor für T_H17-Zellen bekannt und ist beteiligt an der zellvermittelten Autoimmunität [14]. Bisher wurde allerdings kein direkter Einfluss von IL23 auf B-Zellen beschrieben. Zudem wurden in Studien, in denen IL23 als genetisches Adjuvans in DNA-Immunisierungen in Mäusen gegen HCV oder Influenza verwendet wurden, verbesserte zelluläre Immunantworten, aber keine Einflüsse auf humorale Antworten herausgestellt [55, 152]. Da in den vorliegenden Experimenten jedoch eine Verbesserung von Antikörperantworten, aber keine starke Induktion FV-spezifischer CD4⁺ T-Zellantworten beobachtet wurde, kann auf einen unbekannten, direkten Effekt von IL23 auf B-Zellen geschlossen werden. Ein verbesserter Impfschutz war zudem durch Koimmunisierung mit Ad.IL6 zu beobachten, der mit einer leichten, aber statistisch nicht signifikanten Erhöhung neutralisierender Antikörper und verbesserten CD4⁺ T-Zellantworten korrelierte. Möglicherweise ist der adjuvante Effekt von IL6 nicht so stark, da die Gabe von adenoviralen Vektoren bereits die IL6-Expression induziert [158]. Deutlich schwächere Effekte wurden nach Koimmunisierung mit Ad.IL4 oder Ad.IL7 detektiert. IL4 ist das klassische T_H2-Cytokin, das für die Polarisation dieser CD4⁺ T-Zellsubpopulation verantwortlich ist [47]. Es besitzt mit IL6 vergleichbare Eigenschaften in der Stimulation der B-Zellreifung und T_H2-Proliferation [47, 74]. Durch die Koapplikation von Ad.IL4 wurde eine leichte Verbesserung über die Kontrolle der FV-Replikation beobachtet, allerdings bleibt unklar, wodurch diese vermittelt wurde, da keine Veränderungen in den untersuchten Immunantworten festgestellt wurden. Da die Reduktion der Viruslasten jedoch deutlich schlechter war im Vergleich zu IL5, IL6 oder IL23, ist die Verwendung von IL4 als genetisches Adjuvans in Adenovirus-basierten Immunisierungen vernachlässigbar. Im SIV-Modell konnte gezeigt werden, dass die Impfeffizienz eines lebend-attenuierten SIV durch die Verwendung eines IL4-kodierenden, *nef*-deletierten SIV-Vektors verbessert werden konnte. Dieser Schutz korrelierte mit höheren Antikörpern und einer höheren Antikörperaffinität [130]. Diese Beobachtungen lassen schließen, dass das wirkverstärkende Potenzial eines genetischen Adjuvans vom verwendeten Impfvektor abhängen kann. Die schwächsten Effekte der fünf verwendeten Interleukine wurden für IL7 beobachtet, das keine signifikanten Unterschiede in den Viruslasten in Plasma und Milz und

auch nicht in der Immunantwort induzierte. IL7 hat wichtige Rollen in der T-Zellhomöostase [44] und T-Zellentwicklung [52, 98, 144], wodurch die Proliferation und das Überleben von T-Zellen sowie die B-Zellreifung im Knochenmark und der Marginalzone der Lymphknoten gefördert wird [23, 75]. In den durchgeführten Adenovirus-basierten Impfungen ist IL7 möglicherweise aufgrund eines falschen Zeitpunkts oder einer falschen Lokalisation ineffektiv. Der falsche Zeitpunkt bezieht sich auf die Proliferation von T-Zellen, da die IL7-Expression nicht in der Gedächtnisphase vorliegt; für die Stimulation von B-Zellen hingegen ist eventuell die Lokalisation falsch, da die IL7-Expression nicht in den Marginalzonen der Lymphknoten erfolgte.

Es war beachtlich, dass eine große Anzahl der mit Ad.IL5, Ad.IL6 oder Ad.IL23 koimmunisierten Mäuse sehr gut geschützt war und keine Viruslasten in den durchgeführten Tests detektierbar waren. Die Vakzine, die diesen Schutz vermittelte, induzierte ausschließlich Antikörper und CD4⁺ T-Zellantworten. Auch in vorangegangenen Studien, in denen Typ I-Interferone und Chemokine als Adjuvans im FV-Modell eingesetzt worden waren, wurde ein starker Schutz induziert, der hauptsächlich durch FV-spezifische neutralisierende Antikörper und CD4⁺ T-Zellen vermittelt wurde [7, 83]. Diese Beobachtungen unterstreichen die bedeutende Rolle dieser Antworten bei der anti-retroviralen Immunität. Dennoch wurde in Experimenten mit lebend-attenuiertem F-MuLV-N, der bisher einzigen vollständig schützenden Vakzine, gezeigt, dass für einen effektiven Schutz neben CD4⁺ T-Zellen und neutralisierenden Antikörpern CD8⁺ T-Zellantworten essentiell sind [28]. Der Schutz, der durch die Impfung mit Ad.pIXgp70 und den Interleukin-kodierenden Vektoren induziert wurde, ist trotz der Abwesenheit einer Komponente, die CD8⁺ T-Zellen effektiv induziert, sehr stark. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich untersucht, ob der durch Ad.pIXgp70 und Ad.IL5 bzw. Ad.IL23 vermittelte Immunschutz unter Einbeziehung des CTL-induzierenden Vektors Ad5.TxnGagL vergleichbar mit lebend-attenuiertem F-MuLV-N ist. Ad5.TxnGagL exprimiert ein Fusionsprotein aus Thioredoxin und dem *leader* Gag-Epitop des FV und induziert starke CD8⁺ T-Zellantworten. In einer vorherigen Studie konnte durch zweimalige Immunisierung mit diesem Vektor ein sehr guter Schutz induziert werden, bei dem die Viruslasten im Plasma unterhalb der Nachweisgrenze lagen und in der Milz trotz einer sehr hohen Infektionsdosis von 5 000 SFFU FV niedrig waren [49]. Als Vergleichswert dient hierzu die Feststellung, dass eine unbehandelte FV-Infektion mit 15 SFFU in diesen Mäusen innerhalb von 60 Tagen tödlich verläuft [70]. Die Immunisierung mit diesem Vektor in Kombination mit dem Interleukin-adjuvantierten Ad.pIXgp70 resultierte dabei in einem vergleichbaren Schutz wie die Immunisierung mit dem lebend-attenuierten Virus; trotz einer hohen Infektionsdosis entwickelte kein Versuchstier eine Splenomegalie und nur in einzelnen Tieren waren geringe Viruslasten nachweisbar. Unerwartet war, dass auch die einmalige Immunisierung mit der lebend-attenuierten Vakzine nur in einzelnen Tieren neutralisierende Antikörper vor der Belastungsinfektion induzierte; dies

wurde bei der Immunisierung mit adenoviralen Vektoren stets beobachtet und als problematisch angesehen. Die Anwesenheit neutralisierender Antikörper zum Zeitpunkt einer Infektion ist daher offensichtlich nicht essentiell für einen erfolgreichen Impfschutz. Für die Entwicklung neuer anti-retroviraler Vakzinen bedeutet dies jedoch, dass beispielsweise in klinischen Studien vor Infektion nicht festgestellt werden kann, ob schützende Immunantworten induziert werden konnten und ob somit überhaupt ein Immunschutz besteht. Weiterhin stellte sich heraus, dass der Schutz, der durch ein lebend-attenuiertes Retrovirus induziert wurde, nicht mit der Bildung bindender Antikörper korreliert, die jedoch durch die Adenovirus-basierten Impfungen stark induziert wurden. Dies bedeutet, dass bindende Antikörper in der anti-retroviralen Immunität keine essentielle Rolle spielen.

Ob sich die adenoviralen Vektoren, die IL5, IL6 oder IL23 kodierten, auch als genetisches Adjuvans einer Adenovirus-basierten Immunisierung im Influenza-Modell eigneten, wurde zusätzlich untersucht. Bei den Experimenten stellte sich jedoch heraus, dass die eingesetzte Dosis des Vektors Ad5.HA zu hoch war, sodass durch diesen Vektor allein bereits ein starker Immunschutz ausgelöst wurde. Eine Aussage über das adjuvante Potenzial der Interleukinvektoren in diesem Infektionsmodell war somit nicht möglich. Der vermittelte Schutz in den immunisierten Mäusen korrelierte mit hohen neutralisierenden Antikörpertitern. Da die Koimmunisierung mit Ad.IL5 und Ad.IL23 im FV-Modell diese Antworten induzierte, wäre ein verbesserter Impfschutz durch Verwendung dieser Vektoren als Adjuvans durchaus vorstellbar. Daher sollten diese Experimente mit einer angepassten Vektordosis wiederholt werden.

Neben der Verbesserung der Vakzinierungseffizienz von Ad.pIXgp70 durch die Koapplikation von Interleukin-kodierenden Vektoren wurde im Rahmen dieser Arbeit auch das adjuvante Potenzial der Chemokin-kodierenden Vektoren Ad.CCL1, Ad.CCL22 und Ad.CXCL13 untersucht. Die besten Ergebnisse wurden dabei durch Koimmunisierung mit Ad.CCL1 oder Ad.CCL22 erzielt, die allerdings keinen so guten Schutz induzierten wie die adjuvante Verwendung der Interleukinvektoren Ad.IL5 oder Ad.IL23. Der Immunschutz korrelierte auch dabei mit neutralisierenden Antikörpern, die ebenfalls erst nach Belastungsinfektion nachweisbar waren; die detektierten Titer waren allerdings nicht so hoch wie bei den koapplizierten Interleukinen, was vermutlich mit dem beobachteten, nicht so starken Immunschutz korreliert. Dass die Verwendung von CCL1 als Adjuvans nur zu einer leichten Erhöhung von Antikörperantworten führte, wurde auch bei DNA-Vakzinierung gegen HIV-1 gezeigt [139]. Auch für CCL22 ist beschrieben, dass es eingesetzt als Adjuvans humorale Immunantworten verstärkt [71, 97]. Die Chemokine CCL1 und CCL22 wirken durch Bindung an die Rezeptoren CCR8 [160] bzw. CCR4 [13], die von T_H2-Zellen exprimiert werden [72], chemoattraktiv auf T_H2-Zellen und nicht direkt auf B-Zellen. Möglicherweise sind daher die Effekte auf virusspezifische CD4⁺ T-Zellen stärker als auf die humoralen Immunantworten. Weiterhin könnte eine Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen, die im Weiteren humorale Immunantworten verstärkt, erklären, warum die humoralen

Immunantworten nicht so stark sind wie nach einer direkten Stimulation der B-Zellfunktion. Ob die Steigerung der neutralisierenden Antikörperantworten nach Koimmunisierung mit Ad.CCL1 und Ad.CCL22 nun auf einen direkten Effekt der Cytokine auf B-Zellen oder aber auf einen indirekten Mechanismus über die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen zurückzuführen ist, kann anhand der vorliegenden Experimente nicht geklärt werden, da virusspezifische CD4⁺ T-Zellantworten in diesem Zusammenhang nicht untersucht wurden. Kein verbesserter Impfschutz zeigte sich durch Koimmunisierung mit Ad.CXCL13, eine sichere Aussage ist hier allerdings aufgrund der geringen Tierzahl nicht möglich. Dies ist möglicherweise, vergleichbar mit IL7, auf eine falsche Lokalisation der CXCL13-Expression zurückzuführen. Vermutlich vermittelt CXCL13 nur die Steuerung von naiven B-Zellen zu sekundären Lymphgeweben und leitet nicht aktivierte B-Zellen zu Entzündungsherden [72]. In der FV-Infektion wurden verschiedene Chemokin-kodierende Vektoren bereits als Adjuvans in Adenovirus-basierten Vakzinierungsstudien eingesetzt [83]. Dabei wurde ein adjuvanter Effekt von adenoviral kodiertem CCL3 gezeigt; die Ergebnisse lassen sich jedoch nicht direkt mit den hier vorliegenden Daten vergleichen, da in den vorherigen Experimenten die Chemokinvektoren in Kombination mit konventionellen Env- und Gag-kodierenden adenoviralen Vektoren appliziert wurden. Der *expression/display*-Vektor, der hier eingesetzt wurde, ist bereits eine Weiterentwicklung der konventionellen Env- und Gag-Vektoren [6]. Für die Koimmunisierung mit Ad.CCL3 wurde eine Wirkung auf CD4⁺ T-Zellen beschrieben, die wiederum zu erhöhten Antikörperantworten führte [83]. Vermutlich stimulierten auch die Chemokine CCL1 und CCL22 auf diese indirekte Weise die Produktion neutralisierender Antikörper.

Die im Rahmen dieser Arbeit herausgestellten Beobachtungen sollten übertragbar sein auf die Impfung von Menschen mithilfe von adenoviralen Vektoren, da die Funktionen der Interleukine und Chemokine zwischen Mäusen und Menschen sehr ähnlich sind. Allerdings war der adjuvante Effekt, wie bereits beschrieben, hauptsächlich erst nach der Belastungsinfektion feststellbar, was die Testung als prophylaktische Vakzine in klinischen Studien erschwert. Dies betraf jedoch auch die Verwendung der lebend-attenuierten Vakzine F-MuLV-N. Dennoch könnten diese Beobachtungen hilfreich bei der weiteren Entwicklung einer therapeutischen Vakzine sein. Da replikationsdefiziente, adenovirale Vektoren verwendet wurden, sind die Veränderungen im Cytokinmilieu ausschließlich lokal, sodass keine ernsthaften, systemischen Nebenwirkungen bei der Verwendung der Cytokin-kodierenden Vektoren als genetisches Adjuvans zu erwarten sind; bei den durchgeführten Experimenten in Mäusen wurden keine beobachtet.

Bei der Verwendung der Interleukin-kodierenden Vektoren Ad.IL5 und Ad.IL23 als genetisches Adjuvans wurden signifikant höhere neutralisierende Antikörpertiter detektiert, aber keine erhöhten FV-spezifischen CD4⁺ T-Zellantworten. Diese Beobachtung könnte für die HIV-Impfstoffentwicklung besonders attraktiv sein, da HIV bevorzugt HIV-spezifische CD4⁺ T-Zellen infiziert [15] und in verschiedenen vorklinischen und klinischen Studien durch eine Vakzine

induzierte HIV-spezifische CD4⁺ T-Zellen vermutlich eine potenzielle Rolle bei der verstärkten Infektionsrate in nicht-humanen Primaten und Menschen spielen [90, 138, 140]. Somit ist ein Adjuvans, das direkt auf B-Zellen wirkt ohne CD4⁺ T-Zellantworten zu verstärken, in der Tat wünschenswert.

Auch die Verwendung eines adenoviral kodierten Thioredoxin-gp70 Fusionsprotein wurde im Rahmen dieser Arbeit im Hinblick auf einen verbesserten Immunschutz untersucht. Da neutralisierende Antikörper gegen Oberflächenproteine gerichtet sind, sollte durch die Fusion des gp70 an das immunogene Thioredoxin [10, 12] die Immunantwort insbesondere in Bezug auf die Induktion humoraler Antworten verbessert werden. Die kombinierte Immunisierung mit den Vektoren Ad.pIXgp70 und Ad.secTxngp70 induzierte dabei in ersten Experimenten einen sehr guten Schutz, der durch verstärkte bindende sowie neutralisierende Antikörperantworten vermittelt wurde. Allerdings konnte die Impfung mit dem Vektor Ad.secTxngp70 allein den Impfschutz nicht verbessern. Folglich sollten in dem neuen Vektor Ad.secTxngp70^{pIXgp70} die Eigenschaften beider Vektoren vereint werden. Hierzu wurde ein Vektor hergestellt, der das Thioredoxin-gp70 Fusionsprotein kodierte und zusätzlich das an das adenovirale Capsidprotein IX fusionierte Env gp70-Protein auf der Vektoroberfläche präsentierte. Auch in diesem Experiment wurde das Impfergebnis mit dem des etablierten Ad.pIXgp70 verglichen. Der neue Vektor Ad.secTxngp70^{pIXgp70} induzierte einen guten, aber nicht signifikant verbesserten Schutz gegenüber ungeimpften Tieren, der sich in niedrigen Viruslasten und Milzgewichten widerspiegelte. Dieser Schutz korrelierte mit signifikant höheren CD4⁺ T-Zellantworten und guten, allerdings statistisch nicht signifikant höheren neutralisierenden Antikörpertitern im Vergleich zu ungeimpften Kontrolltieren. In diesem Experiment waren jedoch die Tiere, die mit Ad.pIXgp70 immunisiert wurden, bereits signifikant besser geschützt, obwohl der Versuchsablauf vergleichbar mit den vorangegangenen Experimenten war. Zudem zeigte sich auch in den Versuchen mit den Chemokinvektoren eine Tendenz zu einem verbesserten durch Ad.pIXgp70 allein vermittelten Schutz. Weiterhin fiel auf, dass Ad.pIXgp70, der stets starke bindende Antikörpertiter induzierte [6], nun nur noch sehr niedrige Antworten auslöste. Mögliche Erklärungen für diese Beobachtungen sind die Veränderung der Applikationsroute sowie der Bezug der Versuchstiere von unterschiedlichen Züchtern. In vorangegangenen Studien wurde die Applikation adenoviraler Vektoren über die Plantarseite der Hinterfüße als bestgeeignete Methode zur Immunisierung im FV-Modell etabliert [5]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Interleukin-kodierenden Vektoren in den ersten prophylaktischen Experimenten auch auf diese Weise appliziert. Da diese Methode aufgrund neuer tierschutzrechtlicher Bestimmungen nicht mehr erlaubt ist, wurde nach dem Vergleich verschiedener Applikationsrouten die intramuskuläre Immunisierung als Alternative favorisiert. Weiterhin wurden die Versuchstiere nach verschiedenen Problemen von einem anderen Züchter bezogen. Um also die schützende Wirkung des Vektors Ad.secTxngp70^{pIXgp70} sicher bewerten zu können,

müssten die entsprechenden Versuche wiederholt werden. Weiterhin sollten erneut verschiedene Applikationsrouten insbesondere im Hinblick auf Unterschiede bei Antikörperantworten untersucht werden.

Im FV-Modell wurden bereits vielfältige Ansätze bei der Entwicklung einer Vakzine verfolgt. Die bisher einzige Vakzine, die susceptible Mäuse effektiv vor einer FV-Infektion schützt, ist N-tropes F-MuLV, das in dieser Arbeit als Referenz verwendet wurde. Dabei handelt es sich um einen vollständig replikationsfähigen Helfervirus; die Suszeptibilität der Mäuse gegenüber der B- oder N-tropen Helferviren hängt vom *Fv-1*-Typ der Wirtszelle ab. B-tropes F-MuLV, gegen das Mäuse mit *Fv-1^b* höchst suszeptibel sind, wird stets zur Infektion der Mäuse verwendet, wohingegen N-tropes F-MuLV nur in Tieren mit *Fv-1ⁿ* Genotyp eine Infektion auslöst [84]. Die in den Experimenten verwendeten CB6F1-Versuchstiere haben einen *Fv-1^b* Hintergrund, sodass das intakte F-MuLV-N stark attenuiert ist, jedoch einen vollständigen Immunschutz auslösen kann und sich somit als lebend-attenuierte Vakzine eignet [28, 32]. In keiner vorherigen Studie im FV-Modell konnte bisher ein vergleichbarer Immunschutz mit der lebend-attenuierten Vakzine induziert werden. Dabei wurden neben adenoviralen Vektoren auch Env- und Gag-kodierende Vaccinia-Vektoren [32, 93] sowie Peptidimpfstoffe [70, 132] erprobt. Ein direkter Vergleich der Immunisierungsstudien ist jedoch nicht möglich, da in den Experimenten verschiedene Mausstämme mit unterschiedlicher Suszeptibilität verwendet wurden. Bei Versuchen mit rekombinanten Vaccinia-Vektoren wurden (B10.A x A.BY)F1-Mäuse verwendet, die gegenüber einer FV-Infektion deutlich weniger suszeptibel sind als CB6F1-Mäuse [70], die in den Immunisierungsstudien mit adenoviralen Vektoren und Peptidimpfstoffen eingesetzt wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit war insbesondere die Induktion neutralisierender Antikörperantworten, die vor Belastungsinfektion noch immer eher niedrig sind, von Bedeutung, für die bereits gezeigt wurde, dass sie in der FV-Infektion eine wichtige Rolle für den Immunschutz spielen [92]. Trotz unterschiedlicher Mausstämme zeigte der Vergleich der neutralisierenden Antikörpertiter nach Immunisierung mit lebend-attenuiertem F-MuLV-N, dass diese bei (B10.A x A.BY)F1- und CB6F1-Mäusen vergleichbar hoch sind (Vgl. [32] und Abbildung 45). Dies ermöglicht einen Vergleich dieser humoralen Antworten in den verschiedenen Vakzinierungsansätzen. Bei den Immunisierungen mit den Vaccinia-Vektoren [32, 93], den Peptidimpfstoffen [70, 132], aber auch den adenoviralen Vektoren [6, 7, 83] konnten im Vergleich zur lebend-attenuierten Vakzine stets nur deutlich niedrigere neutralisierende Antikörpertiter induziert werden. Die Immunisierung mit dem *expression/display*-Vektor und den Interleukinvektoren Ad.IL5 und Ad.IL23 resultierte nun erstmals in einer vergleichbar hohen Immunantwort.

6.2 Therapeutische Vakzinierung

Zusätzlich zur Verbesserung einer prophylaktischen Vakzine wurden in Pilotexperimenten verschiedene Ansätze für die Entwicklung einer Adenovirus-basierten therapeutischen Impfung verfolgt. An der Beseitigung einer bestehenden Virusinfektion sind aufgrund ihrer cytotoxischen Fähigkeiten hauptsächlich CD8⁺ T-Zellen beteiligt. Ihre Effektorfunktion wird im Immunsystem durch regulatorische T-Zellen kontrolliert, da eine zu starke cytotoxische Aktivität den eigenen Organismus angreift und somit beispielsweise zu Gewebeschäden führen würde. Kommt es hingegen zu einem Ungleichgewicht auf Seiten der regulatorischen T-Zellen, wodurch die CD8⁺ T-Zellantwort frühzeitig inhibiert wird, führt dies dazu, dass das Immunsystem das Virus nicht vollständig eliminieren kann, wodurch sich eine persistierende Infektion ausbildet; an der Ausbildung einer chronischen Infektionen bei FV [29] oder HIV [73] sind maßgeblich regulatorische T-Zellen beteiligt und gleichzeitig wird eine Dysfunktion der CD8⁺ T-Zellen beobachtet [157].

Als therapeutische Vakzinen wurden zunächst adenovirale Vektorkombinationen getestet, die in prophylaktischen Impfungen einen guten Schutz induzierten. In chronisch FV-infizierten Tieren wurden durch Vakzinierung mit Ad.pIXgp70 und Ad.IL5 sowie Ad.env in Kombination mit Ad.IFN α 4 oder Ad.CCL3 keine Unterschiede in den Viruslasten beobachtet, gleichzeitig wurde in den immunisierten Tieren aber auch keine verstärkte Aktivierung regulatorischer T-Zellen festgestellt. Weiterhin wurde in dieser Arbeit der CTL-induzierende adenovirale Vektor Ad5.TxnGagL verwendet. Hierbei war meist eine Tendenz zu einer höheren regulatorischen T-Zellaktivierung im Vergleich zu ungeimpften, chronisch infizierten Mäusen zu beobachten, die vermutlich der cytotoxischen T-Zellantwort entgegenwirkte, sodass keine reduzierte Viruslast detektiert werden konnte. Durch die Vorimmunisierung mit verschiedenen Cytokin-kodierenden Vektoren sollte der Impferfolg verbessert werden, wozu drei unterschiedliche Ansätze verfolgt wurden. Durch IL4, dem Hauptwachstumsfaktor von T_H2-Zellen [47], sollten durch Veränderung des Cytokinmilieus CD4⁺ T-Zellen gegen den adenoviralen Vektor induziert werden, die dann kreuzreaktiv die FV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort durch Ad5.TxnGagL unterstützen sollte. Allerdings hatte diese Immunisierung keinen Einfluss auf die Viruslast und zudem wurden in den mit Ad5.IL4 vorimmunisierten Tieren höhere Aktivierungen der regulatorischen T-Zellen im Vergleich zu den ungeimpften Kontrolltieren detektiert, wodurch die Effektorfunktion der CD8⁺ T-Zellen möglicherweise gesenkt wurde. Zur Verstärkung der cytotoxischen T-Zellantwort wurde das Immunsystem dann durch Vorimmunisierung mit Ad5.IFN γ moduliert. Das proinflammatorische IFN γ wird von T_H1-Zellen exprimiert und wirkt antiviral [22]. Allerdings war in den Versuchstieren nach Präimmunisierung mit Ad5.IFN γ keine erhöhte cytotoxische T-Zellantwort messbar, gleichzeitig aber auch keine höhere Aktivierung regulatorischer T-Zellen im Vergleich zu ungeimpften, chronisch infizierten Tieren. Diese war vermutlich verantwortlich für die niedrigere Viruslast, die in einigen Tieren in den

Lymphknoten detektiert wurde. Obwohl die Aktivität regulatorischer T-Zellen in den mit Ad5.IFN γ präimmunisierten Mäusen im Bereich der einer naiven Maus lag, war dennoch nur eine leichte Reduktion der Viruslast detektierbar. Offenbar ist die Induktion cytotoxischer T-Zellen durch einmalige Immunisierung mit Ad5.TxnGagL in der chronischen FV-Infektion nicht ausreichend, auch wenn dabei regulatorische T-Zellen nicht weiter expandiert oder aktiviert werden. Die besten Effekte wurden im Rahmen dieser Arbeit durch Präimmunisierung mit Ad5.IL23 erreicht. IL23 ist beschrieben als T_H1-Cytokin [64] sowie als Suppressor von regulatorischen T-Zellen [66]. Die kurz vor der eigentlichen Impfung mit Ad5.TxnGagL erfolgte Stimulation des Immunsystems durch Ad5.IL23 zeigte in einzelnen Tieren niedrigere Viruslasten als in den ungeimpften Kontrolltieren, die allerdings bei kombinierter Applikation beider Vektoren zu einem Zeitpunkt nicht zu beobachten war. In den präimmunisierten Tieren waren mehr GzmB-exprimierende CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu ungeimpften Kontrolltieren detektierbar; nach kombinierter Impfung wurden höhere IFN γ -exprimierende CD8⁺ T-Zellantworten ermittelt. Bei der Analyse der regulatorischen T-Zellen war die Aktivierung höher als in den ungeimpften Tieren. In den vorliegenden Pilotexperimenten konnte also kein inhibierender Effekt von IL23 auf die Aktivität von regulatorischen T-Zellen festgestellt werden. Da die Aktivierung regulatorischer T-Zellen in der chronischen FV-Infektion eine entscheidende Rolle spielt, muss diese auch bei zukünftigen therapeutischen Vakzinierungsversuchen berücksichtigt werden. Eventuell sind für die Präimmunisierung andere Cytokine besser geeignet, die die Induktion Foxp3⁺ T-Zellen direkt inhibieren; für IL23 wurde kein direkter Effekt auf die TGF β -vermittelte Foxp3-Induktion beschrieben [66]. Möglicherweise eignen sich hierfür die Interleukine IL6 und IL21, die an der Differenzierung von T_H17-Zellen beteiligt sind und dabei direkt die Foxp3-Induktion inhibieren [11, 77, 107]. Zudem inhibiert IL27 die Foxp3-Induktion *in vitro* [104]. Da in der chronischen FV-Infektion zum Zeitpunkt der therapeutischen Impfung regulatorische T-Zellen bereits induziert sind, ist fraglich, ob diese Cytokine auch dann noch eine inhibierende Wirkung auf eine weitere Aktivierung der regulatorischen T-Zellen haben. In murinen Tumormodellen konnte allerdings ein verringertes Tumorwachstum nach Impfung mit IL6 und IL21 gezeigt werden, das mit einer Reduktion der Anzahl regulatorischer T-Zellen korrelierte [146, 155]. Zusätzlich war bei der Immunisierung mit Ad.pIXgp70 und IL5 bzw. Ad.env und CCL3 eine Tendenz zu einer niedrigeren Aktivierung der regulatorischen T-Zellen festzustellen, sodass sich potenziell auch diese Cytokine für die Präimmunisierung eignen könnten.

7 Zusammenfassung

Die Induktion effektiver neutralisierender Antikörperantworten durch eine anti-retrovirale Vakzine ist nach wie vor ein herausforderndes Problem. Im FV-Modell wurde daher der adjuvante Effekt verschiedener Cytokin-kodierender adenoviraler Vektoren in der anti-retroviralen Immunisierung untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Impfeffizienz des *expression/display*-Vektors Ad.pIXgp70 durch die Koimmunisierung mit adenoviralen Vektoren, die die Cytokine IL5, IL6, IL23 oder CCL1 exprimierten, deutlich verbessert werden konnte. Dieser Impfschutz spiegelte sich in reduzierten Viruslasten und einer besseren Kontrolle über die FV-induzierte Splenomegalie wider und korrelierte mit starken neutralisierenden Antikörperantworten nach der Belastungsinfektion. Die stärksten Effekte wurden durch Koimmunisierung mit Ad.IL5 und Ad.IL23 erzielt; dabei konnten trotz einer hohen Infektionsdosis nur in einzelnen Tieren Viruslasten nachgewiesen werden. Da dieser sehr gute Schutz bedingt durch die verwendeten Vakzinkombinationen ausschließlich CD4⁺ T-Zellen und neutralisierende Antikörper auslöste, wurde die Impfung zusätzlich durch den CTL-induzierenden Vektor Ad5.TxnGagL erweitert. Der dadurch induzierte Schutz korrelierte mit hohen neutralisierenden Antikörpertitern sowie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantworten, und war vergleichbar mit dem eines lebend-attenuierten Impfstoffs, der bisher einzigen effektiven Vakzine.

Zudem zeigte sich ein starker adjuvanter Effekt durch einen adenoviralen Vektor, der ein Fusionsprotein aus Thioredoxin und dem viralen Oberflächenprotein gp70 kodierte. Die Immunisierung mit diesem Vektor zusammen mit Ad.pIXgp70 induzierte einen sehr guten Schutz, der ebenfalls durch hohe neutralisierende Antikörpertiter vermittelt wurde. Allerdings konnten diese Impferfolge durch einen neuen Vektor Ad.secTxngp70^{pIXgp70}, der die Eigenschaften beider Vektoren in einem rekombinanten Adenovirus kombinieren sollte, nicht erzielt werden.

In der chronischen FV-Infektion wurden in Pilotexperimenten adenovirale Vektoren zur therapeutischen Immunisierung eingesetzt. Die Immunisierung mit IL5-adjuvantiertem Ad.pIXgp70 hatte genauso wie die Kombination aus Ad5.env und CCL3- bzw. IFN α 4-kodierenden Vektoren keinen Einfluss auf die chronische Viruslast. Auch die Impfung mit dem CTL-induzierenden Vektor Ad5.TxnGagL mit vorheriger Präimmunisierung mit Ad5.IL4 konnte die Viruslast in den chronisch infizierten Tieren nicht senken. In einzelnen Tieren wurden nach Präimmunisierung mit Ad5.IFN γ oder der Stimulation des Immunsystems durch Ad5.IL23 und anschließender Impfung mit Ad5.TxnGagL niedrigere Viruslasten im Vergleich zu unbehandelten, chronisch infizierten Kontrolltieren detektiert.

In dieser Arbeit konnten durch den Einsatz genetischer Adjuvanzien neue Impfstrategien etabliert und erstmals ein mit einem lebend-attenuierten Retrovirus vergleichbarer Immunschutz durch adenovirale Vektoren induziert werden.

Literaturverzeichnis

1. **Influenza in Glasgow.** *British medical journal* 1933, **1**:278.
2. Aarden, LA, Brunner, TK, Cerottini, J-C, et al: **Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factors.** *Journal of immunology* 1979, **123**:2928-2929.
3. Auten, MW, Huang, W, Dai, G, et al: **CD40 ligand enhances immunogenicity of vector-based vaccines in immunocompetent and CD4+ T cell deficient individuals.** *Vaccine* 2012, **30**:2768-2777.
4. Barre-Sinoussi, F, Chermann, JC, Rey, F, et al: **Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).** *Science* 1983, **220**:868-871.
5. Bayer, W, Schimmer, S, Hoffmann, D, et al: **Evaluation of the Friend Virus model for the development of improved adenovirus-vectored anti-retroviral vaccination strategies.** *Vaccine* 2008, **26**:716-726.
6. Bayer, W, Tenbusch, M, Lietz, R, et al: **Vaccination with an adenoviral vector that encodes and displays a retroviral antigen induces improved neutralizing antibody and CD4+ T-cell responses and confers enhanced protection.** *Journal of virology* 2010, **84**:1967-1976.
7. Bayer, W, Lietz, R, Ontikatz, T, et al: **Improved vaccine protection against retrovirus infection after co-administration of adenoviral vectors encoding viral antigens and type I interferon subtypes.** *Retrovirology* 2011, **8**:75.
8. Belshe, RB, Edwards, KM, Vesikari, T, et al: **Live attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children.** *The New England journal of medicine* 2007, **356**:685-696.
9. Bergelson, JM: **Receptors mediating adenovirus attachment and internalization.** *Biochemical pharmacology* 1999, **57**:975-979.
10. Bertini, R, Howard, OM, Dong, HF, et al: **Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells.** *The Journal of experimental medicine* 1999, **189**:1783-1789.
11. Bettelli, E, Carrier, Y, Gao, W, et al: **Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells.** *Nature* 2006, **441**:235-238.
12. Blum, H, Rollinghoff, M, Gessner, A: **Expression and co-cytokine function of murine thioredoxin/adult T cell leukaemia-derived factor (ADF).** *Cytokine* 1996, **8**:6-13.
13. Bonecchi, R, Bianchi, G, Bordignon, PP, et al: **Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s.** *The Journal of experimental medicine* 1998, **187**:129-134.
14. Boniface, K, Blom, B, Liu, YJ, et al: **From interleukin-23 to T-helper 17 cells: human T-helper cell differentiation revisited.** *Immunological reviews* 2008, **226**:132-146.
15. Brenchley, JM, Ruff, LE, Casazza, JP, et al: **Preferential infection shortens the life span of human immunodeficiency virus-specific CD4+ T cells in vivo.** *Journal of virology* 2006, **80**:6801-6809.
16. Brocker, C, Thompson, D, Matsumoto, A, et al: **Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family.** *Human genomics* 2010, **5**:30-55.
17. Buchbinder, SP, Mehrotra, DV, Duerr, A, et al: **Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial.** *Lancet* 2008, **372**:1881-1893.
18. Chesebro, B, Wehrly, K, Stimpfling, J: **Host genetic control of recovery from Friend leukemia virus-induced splenomegaly: mapping of a gene within the major histocompatibility complex.** *The Journal of experimental medicine* 1974, **140**:1457-1467.

19. Chesebro, B, Britt, W, Evans, L, et al: **Characterization of monoclonal antibodies reactive with murine leukemia viruses: use in analysis of strains of friend MCF and Friend ecotropic murine leukemia virus.** *Virology* 1983, **127**:134-148.
20. Clark, SP, Mak, TW: **Complete nucleotide sequence of an infectious clone of Friend spleen focus-forming provirus: gp55 is an envelope fusion glycoprotein.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1983, **80**:5037-5041.
21. Coffman, RL, Ohara, J, Bond, MW, et al: **B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells.** *Journal of immunology* 1986, **136**:4538-4541.
22. Commins, SP, Borish, L, Steinke, JW: **Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines.** *The Journal of allergy and clinical immunology* 2010, **125**:S53-72.
23. Corfe, SA, Paige, CJ: **The many roles of IL-7 in B cell development; mediator of survival, proliferation and differentiation.** *Seminars in immunology* 2012, **24**:198-208.
24. Crowe, CR, Chen, K, Pociask, DA, et al: **Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection.** *Journal of immunology* 2009, **183**:5301-5310.
25. Danthinne, X, Imperiale, MJ: **Production of first generation adenovirus vectors: a review.** *Gene therapy* 2000, **7**:1707-1714.
26. Dela Cruz, JS, Lau, SY, Ramirez, EM, et al: **Protein vaccination with the HER2/neu extracellular domain plus anti-HER2/neu antibody-cytokine fusion proteins induces a protective anti-HER2/neu immune response in mice.** *Vaccine* 2003, **21**:1317-1326.
27. Dittmer, U, Brooks, DM, Hasenkrug, KJ: **Characterization of a live-attenuated retroviral vaccine demonstrates protection via immune mechanisms.** *Journal of virology* 1998, **72**:6554-6558.
28. Dittmer, U, Brooks, DM, Hasenkrug, KJ: **Requirement for multiple lymphocyte subsets in protection by a live attenuated vaccine against retroviral infection.** *Nature medicine* 1999, **5**:189-193.
29. Dittmer, U, He, H, Messer, RJ, et al: **Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection.** *Immunity* 2004, **20**:293-303.
30. Dong, C: **Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells.** *Nature reviews Immunology* 2006, **6**:329-333.
31. Douglas, JT: **Adenoviral vectors for gene therapy.** *Molecular biotechnology* 2007, **36**:71-80.
32. Earl, PL, Moss, B, Morrison, RP, et al: **T-lymphocyte priming and protection against Friend leukemia by vaccinia-retrovirus env gene recombinant.** *Science* 1986, **234**:728-731.
33. Ehrhardt, A, Kay, MA: **Gutted adenovirus: a rising star on the horizon?** *Gene therapy* 2005, **12**:1540-1541.
34. Enders, JF, Peebles, TC: **Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles.** *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 1954, **86**:277-286.
35. Fakruddin, JM, Lempicki, RA, Gorelick, RJ, et al: **Noninfectious papilloma virus-like particles inhibit HIV-1 replication: implications for immune control of HIV-1 infection by IL-27.** *Blood* 2007, **109**:1841-1849.
36. Fallaux, FJ, Bout, A, van der Velde, I, et al: **New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses.** *Human gene therapy* 1998, **9**:1909-1917.
37. Fauci, AS, Fischinger, PJ: **The development of an AIDS vaccine: progress and promise.** *Public health reports* 1988, **103**:230-236.
38. Fazilleau, N, Mark, L, McHeyzer-Williams, LJ, et al: **Follicular helper T cells: lineage and location.** *Immunity* 2009, **30**:324-335.

39. Flynn, NM, Forthal, DN, Harro, CD, et al: **Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection.** *The Journal of infectious diseases* 2005, **191**:654-665.
40. Forbes, EK, de Cassan, SC, Llewellyn, D, et al: **T cell responses induced by adenoviral vectored vaccines can be adjuvanted by fusion of antigen to the oligomerization domain of C4b-binding protein.** *PloS one* 2012, **7**:e44943.
41. Fouchier, RA, Bestebroer, TM, Herfst, S, et al: **Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene.** *Journal of clinical microbiology* 2000, **38**:4096-4101.
42. Friend, C: **Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia.** *The Journal of experimental medicine* 1957, **105**:307-318.
43. Fruh, K, Yang, Y: **Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma.** *Current opinion in immunology* 1999, **11**:76-81.
44. Fry, TJ, Connick, E, Falloon, J, et al: **A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis.** *Blood* 2001, **97**:2983-2990.
45. Gaggar, A, Shayakhmetov, DM, Lieber, A: **CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses.** *Nature medicine* 2003, **9**:1408-1412.
46. Geiselhart, LA, Humphries, CA, Gregorio, TA, et al: **IL-7 administration alters the CD4:CD8 ratio, increases T cell numbers, and increases T cell function in the absence of activation.** *Journal of immunology* 2001, **166**:3019-3027.
47. Gilmour, J, Lavender, P: **Control of IL-4 expression in T helper 1 and 2 cells.** *Immunology* 2008, **124**:437-444.
48. Ginsberg, HS: **The life and times of adenoviruses.** *Advances in virus research* 1999, **54**:1-13.
49. Godel, P, Windmann, S, Dietze, KK, et al: **Modification of one epitope-flanking amino acid allows for the induction of friend retrovirus-specific CD8+ T cells by Adenovirus-based immunization.** *Journal of virology* 2012, **86**:12422-12425.
50. Gonzalez-Garcia, I, Ocana, E, Jimenez-Gomez, G, et al: **Immunization-induced perturbation of human blood plasma cell pool: progressive maturation, IL-6 responsiveness, and high PRDI-BF1/BLIMP1 expression are critical distinctions between antigen-specific and nonspecific plasma cells.** *Journal of immunology* 2006, **176**:4042-4050.
51. Gonzalez, MC, Kostrzak, A, Guetard, D, et al: **HIV-1 derived peptides fused to HBsAg affect its immunogenicity.** *Virus research* 2009, **146**:107-114.
52. Grabstein, KH, Waldschmidt, TJ, Finkelman, FD, et al: **Inhibition of murine B and T lymphopoiesis in vivo by an anti-interleukin 7 monoclonal antibody.** *The Journal of experimental medicine* 1993, **178**:257-264.
53. Graham, FL, van der Eb, AJ: **A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA.** *Virology* 1973, **52**:456-467.
54. Gregory, SH, Wing, EJ: **IFN-gamma inhibits the replication of Listeria monocytogenes in hepatocytes.** *Journal of immunology* 1993, **151**:1401-1409.
55. Ha, SJ, Kim, DJ, Baek, KH, et al: **IL-23 induces stronger sustained CTL and Th1 immune responses than IL-12 in hepatitis C virus envelope protein 2 DNA immunization.** *Journal of immunology* 2004, **172**:525-531.
56. Harro, CD, Judson, FN, Gorse, GJ, et al: **Recruitment and baseline epidemiologic profile of participants in the first phase 3 HIV vaccine efficacy trial.** *Journal of acquired immune deficiency syndromes* 2004, **37**:1385-1392.
57. Hasenkrug, KJ, Valenzuela, A, Letts, VA, et al: **Chromosome mapping of Rfv3, a host resistance gene to Friend murine retrovirus.** *Journal of virology* 1995, **69**:2617-2620.
58. Hasenkrug, KJ, Brooks, DM, Robertson, MN, et al: **Immunoprotective determinants in friend murine leukemia virus envelope protein.** *Virology* 1998, **248**:66-73.
59. He, TC, Zhou, S, da Costa, LT, et al: **A simplified system for generating recombinant adenoviruses.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**:2509-2514.
60. Hoatlin, ME, Kabat, D: **Host-range control of a retroviral disease: Friend erythroleukemia.** *Trends in microbiology* 1995, **3**:51-57.

61. Hoffmann, D, Bayer, W, Heim, A, et al: **Evaluation of twenty-one human adenovirus types and one infectivity-enhanced adenovirus for the treatment of malignant melanoma.** *The Journal of investigative dermatology* 2008, **128**:988-998.
62. Holterman, L, Vogels, R, van der Vlugt, R, et al: **Novel replication-incompetent vector derived from adenovirus type 11 (Ad11) for vaccination and gene therapy: low seroprevalence and non-cross-reactivity with Ad5.** *Journal of virology* 2004, **78**:13207-13215.
63. Hou, W, Kang, HS, Kim, BS: **Th17 cells enhance viral persistence and inhibit T cell cytotoxicity in a model of chronic virus infection.** *The Journal of experimental medicine* 2009, **206**:313-328.
64. Hunter, CA: **New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions.** *Nature reviews Immunology* 2005, **5**:521-531.
65. International AIDS Vaccine Initiative (IAVI): **AIDS Vaccine Blueprint 2008.** 2008.
66. Izcue, A, Hue, S, Buonocore, S, et al: **Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis.** *Immunity* 2008, **28**:559-570.
67. Jarrett, WF, Crawford, EM, Martin, WB, et al: **A Virus-Like Particle Associated with Leukemia (Lymphosarcoma).** *Nature* 1964, **202**:567-569.
68. Kalams, SA, Parker, SD, Elizaga, M, et al: **Safety and comparative immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine in combination with plasmid interleukin 12 and impact of intramuscular electroporation for delivery.** *The Journal of infectious diseases* 2013, **208**:818-829.
69. Kamen, A, Henry, O: **Development and optimization of an adenovirus production process.** *The journal of gene medicine* 2004, **6 Suppl 1**:S184-192.
70. Kawabata, H, Niwa, A, Tsuji-Kawahara, S, et al: **Peptide-induced immune protection of CD8+ T cell-deficient mice against Friend retrovirus-induced disease.** *International immunology* 2006, **18**:183-198.
71. Kikuchi, T, Crystal, RG: **Antigen-pulsed dendritic cells expressing macrophage-derived chemokine elicit Th2 responses and promote specific humoral immunity.** *The Journal of clinical investigation* 2001, **108**:917-927.
72. Kim, CH, Broxmeyer, HE: **Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function.** *Journal of leukocyte biology* 1999, **65**:6-15.
73. Kinter, AL, Hennessey, M, Bell, A, et al: **CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status.** *The Journal of experimental medicine* 2004, **200**:331-343.
74. Kishimoto, T: **IL-6: from its discovery to clinical applications.** *International immunology* 2010, **22**:347-352.
75. Kittipatarin, C, Khaled, AR: **Interlinking interleukin-7.** *Cytokine* 2007, **39**:75-83.
76. Kochanek, S, Clemens, PR, Mitani, K, et al: **A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, **93**:5731-5736.
77. Korn, T, Bettelli, E, Gao, W, et al: **IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells.** *Nature* 2007, **448**:484-487.
78. Kostense, S, Koudstaal, W, Sprangers, M, et al: **Adenovirus types 5 and 35 seroprevalence in AIDS risk groups supports type 35 as a vaccine vector.** *AIDS* 2004, **18**:1213-1216.
79. Kouro, T, Takatsu, K: **IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy.** *International immunology* 2009, **21**:1303-1309.
80. Lander, MR, Chattopadhyay, SK: **A Mus dunni cell line that lacks sequences closely related to endogenous murine leukemia viruses and can be infected by ectropic, amphotropic, xenotropic, and mink cell focus-forming viruses.** *Journal of virology* 1984, **52**:695-698.

81. Legler, DF, Loetscher, M, Roos, RS, et al: **B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5.** *The Journal of experimental medicine* 1998, **187**:655-660.
82. Lemckert, AA, Grimbergen, J, Smits, S, et al: **Generation of a novel replication-incompetent adenoviral vector derived from human adenovirus type 49: manufacture on PER.C6 cells, tropism and immunogenicity.** *The Journal of general virology* 2006, **87**:2891-2899.
83. Lietz, R, Bayer, W, Ontikatz, T, et al: **Codelivery of the chemokine CCL3 by an adenovirus-based vaccine improves protection from retrovirus infection.** *Journal of virology* 2012, **86**:1706-1716.
84. Lilly, F, Pincus, T: **Genetic control of murine viral leukemogenesis.** *Advances in cancer research* 1973, **17**:231-277.
85. Liu, D, Niu, ZX: **Construction, expression and immunoassay detection of recombinant plasmid encoding fusion protein of Roman chicken complement C3d and Newcastle disease virus F gene.** *Scandinavian journal of immunology* 2008, **68**:598-606.
86. Lynch, RM, Yamamoto, T, McDermott, AB: **HIV vaccine research and discovery in the nonhuman primates model: a unified theory in acquisition prevention and control of SIV infection.** *Current opinion in HIV and AIDS* 2013, **8**:288-294.
87. Mangan, PR, Harrington, LE, O'Quinn, DB, et al: **Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage.** *Nature* 2006, **441**:231-234.
88. Mantovani, A, Gray, PA, Van Damme, J, et al: **Macrophage-derived chemokine (MDC).** *Journal of leukocyte biology* 2000, **68**:400-404.
89. Marthas, ML, Miller, CJ, Sutjipto, S, et al: **Efficacy of live-attenuated and whole-inactivated simian immunodeficiency virus vaccines against vaginal challenge with virulent SIV.** *Journal of medical primatology* 1992, **21**:99-107.
90. Masek-Hammerman, K, Li, H, Liu, J, et al: **Mucosal trafficking of vector-specific CD4+ T lymphocytes following vaccination of rhesus monkeys with adenovirus serotype 5.** *Journal of virology* 2010, **84**:9810-9816.
91. McVail, JC: **Cow-Pox and Small-Pox: Jenner, Woodville, and Pearson.** *British medical journal* 1896, **1**:1271-1276.
92. Messer, RJ, Dittmer, U, Peterson, KE, et al: **Essential role for virus-neutralizing antibodies in sterilizing immunity against Friend retrovirus infection.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**:12260-12265.
93. Miyazawa, M, Nishio, J, Chesebro, B: **Protection against Friend retrovirus-induced leukemia by recombinant vaccinia viruses expressing the gag gene.** *Journal of virology* 1992, **66**:4497-4507.
94. Moser, B, Loetscher, P: **Lymphocyte traffic control by chemokines.** *Nature immunology* 2001, **2**:123-128.
95. Mosmann, TR, Cherwinski, H, Bond, MW, et al: **Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.** *Journal of immunology* 1986, **136**:2348-2357.
96. Mosmann, TR, Coffman, RL: **TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.** *Annual review of immunology* 1989, **7**:145-173.
97. Movsesyan, N, Ghochikyan, A, Mkrtichyan, M, et al: **Reducing AD-like pathology in 3xTg-AD mouse model by DNA epitope vaccine - a novel immunotherapeutic strategy.** *PloS one* 2008, **3**:e2124.
98. Murray, R, Suda, T, Wrighton, N, et al: **IL-7 is a growth and maintenance factor for mature and immature thymocyte subsets.** *International immunology* 1989, **1**:526-531.
99. Myers, KP, Olsen, CW, Gray, GC: **Cases of swine influenza in humans: a review of the literature.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2007, **44**:1084-1088.

100. Naderi, M, Saeedi, A, Moradi, A, et al: **Interleukin-12 as a genetic adjuvant enhances hepatitis C virus NS3 DNA vaccine immunogenicity.** *Virologica Sinica* 2013, **28**:167-173.
101. Nagata, S: **Fas-mediated apoptosis.** *Advances in experimental medicine and biology* 1996, **406**:119-124.
102. Namkoong, H, Song, MY, Seo, YB, et al: **Enhancement of antigen-specific CD8 T cell responses by co-delivery of Fc-fused CXCL11.** *Vaccine* 2013.
103. Nayak, BP, Sailaja, G, Jabbar, AM: **Enhancement of gp120-specific immune responses by genetic vaccination with the human immunodeficiency virus type 1 envelope gene fused to the gene coding for soluble CTLA4.** *Journal of virology* 2003, **77**:10850-10861.
104. Neufert, C, Becker, C, Wirtz, S, et al: **IL-27 controls the development of inducible regulatory T cells and Th17 cells via differential effects on STAT1.** *European journal of immunology* 2007, **37**:1809-1816.
105. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID): **NIH Discontinues Immunizations in HIV Vaccine Study.** 2013 [<http://www.hvti.org/505-announcement-25April2013.html>] (26.11.2013)
106. Nilsson, M, Ljungberg, J, Richter, J, et al: **Development of an adenoviral vector system with adenovirus serotype 35 tropism; efficient transient gene transfer into primary malignant hematopoietic cells.** *The journal of gene medicine* 2004, **6**:631-641.
107. Nurieva, RI, Chung, Y, Hwang, D, et al: **Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages.** *Immunity* 2008, **29**:138-149.
108. Oyoshi, MK, Elkhail, A, Kumar, L, et al: **Vaccinia virus inoculation in sites of allergic skin inflammation elicits a vigorous cutaneous IL-17 response.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**:14954-14959.
109. Parham, C, Chirica, M, Timans, J, et al: **A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R.** *Journal of immunology* 2002, **168**:5699-5708.
110. Persons, DA, Paulson, RF, Loyd, MR, et al: **Fv2 encodes a truncated form of the Stk receptor tyrosine kinase.** *Nature genetics* 1999, **23**:159-165.
111. Peters, W, Brandl, JR, Lindbloom, JD, et al: **Oral administration of an adenovirus vector encoding both an avian influenza A hemagglutinin and a TLR3 ligand induces antigen specific granzyme B and IFN-gamma T cell responses in humans.** *Vaccine* 2013, **31**:1752-1758.
112. Philipson, L, Pettersson, RF: **The coxsackie-adenovirus receptor--a new receptor in the immunoglobulin family involved in cell adhesion.** *Current topics in microbiology and immunology* 2004, **273**:87-111.
113. Pitisuttithum, P, Gilbert, P, Gurwith, M, et al: **Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand.** *The Journal of infectious diseases* 2006, **194**:1661-1671.
114. Poiesz, BJ, Ruscetti, FW, Gazdar, AF, et al: **Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980, **77**:7415-7419.
115. Portnoy, DA, Schreiber, RD, Connelly, P, et al: **Gamma interferon limits access of *Listeria monocytogenes* to the macrophage cytoplasm.** *The Journal of experimental medicine* 1989, **170**:2141-2146.
116. Ratto-Kim, S, Currier, JR, Cox, JH, et al: **Heterologous prime-boost regimens using rAd35 and rMVA vectors elicit stronger cellular immune responses to HIV proteins than homologous regimens.** *PloS one* 2012, **7**:e45840.
117. Reperant, LA, Kuiken, T, Osterhaus, AD: **Influenza viruses: from birds to humans.** *Human vaccines & immunotherapeutics* 2012, **8**:7-16.

118. Rerks-Ngarm, S, Pitisuttithum, P, Nitayaphan, S, et al: **Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand.** *The New England journal of medicine* 2009, **361**:2209-2220.
119. Robert-Koch-Institut (RKI): **Was ist bei dem Influenza-Lebendimpfstoff zu beachten?** 2013
[http://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Impfen/Influenza/faq_ges.html?nn=2370434]
(26.11.2013)
120. Rous, P: **A transmissible avian neoplasm. (Sarcoma of the common fowl) by Peyton Rous, M.D., Experimental Medicine for Sept. 1, 1910, vol. 12, pp.696-705.** *The Journal of experimental medicine* 1979, **150**:738-753.
121. Rowe, WP, Huebner, RJ, Gilmore, LK, et al: **Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture.** *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 1953, **84**:570-573.
122. Rubio, I, Bolchi, A, Moretto, N, et al: **Potent anti-HPV immune responses induced by tandem repeats of the HPV16 L2 (20 -- 38) peptide displayed on bacterial thioredoxin.** *Vaccine* 2009, **27**:1949-1956.
123. Russell, WC: **Update on adenovirus and its vectors.** *The Journal of general virology* 2000, **81**:2573-2604.
124. Rux, JJ, Burnett, RM: **Adenovirus structure.** *Human gene therapy* 2004, **15**:1167-1176.
125. Sakaguchi, S: **Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses.** *Annual review of immunology* 2004, **22**:531-562.
126. Schepers, K, Toebe, M, Sotthwes, G, et al: **Differential kinetics of antigen-specific CD4+ and CD8+ T cell responses in the regression of retrovirus-induced sarcomas.** *Journal of immunology* 2002, **169**:3191-3199.
127. Shimizu, T, Uenishi, H, Teramura, Y, et al: **Fine structure of a virus-encoded helper T-cell epitope expressed on FBL-3 tumor cells.** *Journal of virology* 1994, **68**:7704-7708.
128. Shiver, JW, Fu, TM, Chen, L, et al: **Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity.** *Nature* 2002, **415**:331-335.
129. Shope, RE: **The Etiology of Swine Influenza.** *Science* 1931, **73**:214-215.
130. Stahl-Hennig, C, Gundlach, BR, Dittmer, U, et al: **Replication, immunogenicity, and protective properties of live-attenuated simian immunodeficiency viruses expressing interleukin-4 or interferon-gamma.** *Virology* 2003, **305**:473-485.
131. Stromnes, IM, Dittmer, U, Schumacher, TN, et al: **Temporal effects of gamma interferon deficiency on the course of Friend retrovirus infection in mice.** *Journal of virology* 2002, **76**:2225-2232.
132. Sugahara, D, Tsuji-Kawahara, S, Miyazawa, M: **Identification of a protective CD4+ T-cell epitope in p15gag of Friend murine leukemia virus and role of the MA protein targeting the plasma membrane in immunogenicity.** *Journal of virology* 2004, **78**:6322-6334.
133. Swain, SL, McKinsty, KK, Strutt, TM: **Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses.** *Nature reviews Immunology* 2012, **12**:136-148.
134. Takatsu, K, Tominaga, A, Hamaoka, T: **Antigen-induced T cell-replacing factor (TRF). I. Functional characterization of a TRF-producing helper T cell subset and genetic studies on TRF production.** *Journal of immunology* 1980, **124**:2414-2422.
135. Takatsu, K: **Cytokines involved in B-cell differentiation and their sites of action.** *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 1997, **215**:121-133.
136. Takatsu, K, Kouro, T, Nagai, Y: **Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response.** *Advances in immunology* 2009, **101**:191-236.
137. Tan, WG, Jin, HT, West, EE, et al: **Comparative analysis of simian immunodeficiency virus gag-specific effector and memory CD8+ T cells induced by different adenovirus vectors.** *Journal of virology* 2013, **87**:1359-1372.

138. Tenbusch, M, Ignatius, R, Temchura, V, et al: **Risk of immunodeficiency virus infection may increase with vaccine-induced immune response.** *Journal of virology* 2012, **86**:10533-10539.
139. Tsuji, T, Fukushima, J, Hamajima, K, et al: **HIV-1-specific cell-mediated immunity is enhanced by co-inoculation of TCA3 expression plasmid with DNA vaccine.** *Immunology* 1997, **90**:1-6.
140. Uberla, K: **HIV vaccine development in the aftermath of the STEP study: re-focus on occult HIV infection?** *PLoS pathogens* 2008, **4**:e1000114.
141. UNAIDS: **UNAIDS Global Report 2012.** 2012
[http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_en.pdf] (26.09.2013)
142. Vanniasinkam, T, Ertl, HC: **Adenoviral gene delivery for HIV-1 vaccination.** *Current gene therapy* 2005, **5**:203-212.
143. Vitetta, ES, Ohara, J, Myers, CD, et al: **Serological, biochemical, and functional identity of B cell-stimulatory factor 1 and B cell differentiation factor for IgG1.** *The Journal of experimental medicine* 1985, **162**:1726-1731.
144. von Freeden-Jeffry, U, Vieira, P, Lucian, LA, et al: **Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine.** *The Journal of experimental medicine* 1995, **181**:1519-1526.
145. Wallach, D, Varfolomeev, EE, Malinin, NL, et al: **Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms.** *Annual review of immunology* 1999, **17**:331-367.
146. Wang, J, Zhao, F, Dou, J, et al: **Immunotherapy of melanoma by GPI-anchored IL-21 tumour vaccine involves down-regulating regulatory T cells in mouse model.** *International journal of immunogenetics* 2011, **38**:21-29.
147. Weiss, RA: **Gulliver's travels in HIVland.** *Nature* 2001, **410**:963-967.
148. Whitney, JB, Ruprecht, RM: **Live attenuated HIV vaccines: pitfalls and prospects.** *Current opinion in infectious diseases* 2004, **17**:17-26.
149. Wildner, O, Morris, JC, Vahanian, NN, et al: **Adenoviral vectors capable of replication improve the efficacy of HSVtk/GCV suicide gene therapy of cancer.** *Gene therapy* 1999, **6**:57-62.
150. Wildner, O, Morris, JC: **The role of the E1B 55 kDa gene product in oncolytic adenoviral vectors expressing herpes simplex virus-tk: assessment of antitumor efficacy and toxicity.** *Cancer research* 2000, **60**:4167-4174.
151. Wildner, O, Hoffmann, D, Jogler, C, et al: **Comparison of HSV-1 thymidine kinase-dependent and -independent inhibition of replication-competent adenoviral vectors by a panel of drugs.** *Cancer gene therapy* 2003, **10**:791-802.
152. Williman, J, Lockhart, E, Slobbe, L, et al: **The use of Th1 cytokines, IL-12 and IL-23, to modulate the immune response raised to a DNA vaccine delivered by gene gun.** *Vaccine* 2006, **24**:4471-4474.
153. Wilson, JM: **Adenoviruses as gene-delivery vehicles.** *The New England journal of medicine* 1996, **334**:1185-1187.
154. World Health Organization (WHO): **HIV/AIDS.** 2013
[<http://www.who.int/features/qa/71/en/index.html>] (26.11.2013)
155. Wysocki, PJ, Kazimierczak, U, Suchorska, W, et al: **Gene-modified tumor vaccine secreting a designer cytokine Hyper-Interleukin-6 is an effective therapy in mice bearing orthotopic renal cell cancer.** *Cancer gene therapy* 2010, **17**:465-475.
156. Xu, GL, Zhang, KQ, Guo, B, et al: **Induction of protective and therapeutic antitumor immunity by a DNA vaccine with C3d as a molecular adjuvant.** *Vaccine* 2010, **28**:7221-7227.
157. Zelinskyy, G, Robertson, SJ, Schimmer, S, et al: **CD8+ T-cell dysfunction due to cytolytic granule deficiency in persistent Friend retrovirus infection.** *Journal of virology* 2005, **79**:10619-10626.
158. Zhang, Y, Chirmule, N, Gao, GP, et al: **Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages.** *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2001, **3**:697-707.

- 159. Zhang, Y, Bergelson, JM: **Adenovirus receptors**. *Journal of virology* 2005, **79**:12125-12131.
- 160. Zingoni, A, Soto, H, Hedrick, JA, et al: **The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells**. *Journal of immunology* 1998, **161**:547-551.
- 161. Zlotnik, A, Yoshie, O: **Chemokines: a new classification system and their role in immunity**. *Immunity* 2000, **12**:121-127.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulf Dittmer für die gute Betreuung, sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit, sowie die anregenden Diskussionen und Ideen danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Wibke Bayer. Sowohl für die Überlassung des Themas, die sehr gute Einarbeitung als auch dafür, dass sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Weiterhin ermutigte sie mich immer wieder, eigene Ideen einzubringen und gab mir die Freiheit, diese auch umzusetzen.

Zudem möchte ich Jun.-Prof. Dr. Matthias Tenbusch, Klaus Sure und besonders Thomas Niezold für die Möglichkeit und Hilfe bei der Umsetzung der Influenza-Versuche danken.

Weiterhin gilt mein Dank Sonja Windmann und Sandra Francois, sowie unseren Medizinerinnen Phillip, Meike, Dominik und Ina für die helfenden Hände bei einigen Versuchen, das tolle Arbeitsklima auf „unserer“ Etage, die vielen Gespräche abseits des Laboralltags, die teilweise auch zur Vergrößerung des Allgemeinwissens dienten, sowie die immer mal wieder notwendigen, aufmunternden Worte und Gesten.

Auch dem Rest der Arbeitsgruppe und den ehemaligen AG-Mitgliedern möchte ich sehr danken, dafür dass sie immer hilfsbereit waren, ihr Wissen und ihre Erfahrungen gern teilten und auch sonst dem Laboralltag stets eine freundliche Arbeitsatmosphäre gegeben haben.

Ady, Anke und der AG Triling danke ich für die netten und unterhaltsamen Mittagspausen, in denen die ein oder andere witzige Idee entstand, die vielleicht doch irgendwann mal umgesetzt wird.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Familie, die mir diese Ausbildung ermöglicht und mich stets unterstützt hat; meinen Freunden, die mich in allen Höhen und Tiefen meines Studiums begleitet und mir viel Freude bereitet haben. Von ganzem Herzen möchte ich meinem Freund Patrick danken, dafür dass er immer an mich glaubt, mir den Rücken freihält, mich unterstützt, meinen Frust erträgt und immer für mich da ist. Danke!!!

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Verbesserung einer Adenovirus-basierten anti-retroviralen Vakzine durch Verwendung genetischer Adjuvanzen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Inga Ohs befürworte.

Essen, den _____

Prof. Dr. Ulf Dittmer

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Inga Ohs

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Inga Ohs